

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Effets des LDL natives et modifiées sur les cellules endothéliales humaines EAhy926 en condition statique. Implication du facteur de transcription Nrf2

Alaimo, Ledovina

Award date:
2011

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



***FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR***

Faculté des Sciences

**Effets des LDL natives et modifiées sur les cellules
endothéliales humaines EAhy926 en condition statique
Implication du facteur de transcription Nrf2**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Alaimo Ledovina

Janvier 2011

Facultés universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61, 5000 Namur

Téléphone : +32(0)81.72.44.18 – Téléfax : +32(0)81.72.44.20

E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Effets des LDL natives et modifiées sur les cellules endothéliales
humaines EAhy926 en condition statique : Implication du facteur
de transcription Nrf2**

Alaimo Ledovina

Résumé :

L'athérosclérose, maladie inflammatoire, chronique et dégénérative des artères de moyen et gros calibres est décrite comme multifactorielle et liée entre autres à l'hypercholestérolémie. Les lipoprotéines de faible densité (LDL) s'accumulent dans l'intima et s'y oxydent, favorisant la formation d'une plaque athéromateuse. Bien que le modèle d'oxydation au cuivre (OxLDL) soit souvent utilisé *in vitro* pour mimer les LDL oxydées *in vivo*, d'autres acteurs interviennent également dans ce processus d'oxydation, dont la myéloperoxydase (MPO), qui oxyde les LDL en MoxLDL, plus pertinentes d'un point de vue patho-physiologique et présentes au sein des athéromes. Au cours de ce mémoire, nous avons poursuivi le travail de caractérisation des effets différentiels entre OxLDL et MoxLDL, sur les cellules endothéliales en condition statique, travail déjà initié l'année dernière par Ludmilla Caesens-Koenig durant son mémoire. Nous avons ainsi, dans la première partie du mémoire, confirmé que les MoxLDL induisent un stress oxydatif puissant contrairement aux OxLDL, mais que les OxLDL activent la voie Nrf2 et induisent une forte surexpression de *hmx-1*, un gène cible de Nrf2, contrairement aux MoxLDL. De plus, dans la seconde partie du mémoire, nous nous sommes intéressés aux causes possibles à l'origine des effets différentiels entre OxLDL et MoxLDL. Nous avons exclu la voie UPR qui ne semble activée, ni par les OxLDL ni par les MoxLDL. L'utilisation d'inhibiteurs de kinases nous a permis d'expliquer en partie cet effet différentiel. Nos résultats suggèrent que des PKC et en particulier la PKC δ , pourrait expliquer l'activation de la voie Nrf2 par les OxLDL, par phosphorylation et indépendamment d'un stress oxydatif. Par contre pour les MoxLDL, nos résultats suggèrent la possibilité d'une phosphorylation inhibitrice, empêchant l'activation de Nrf2 malgré le stress oxydatif.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2011

Promoteur : M. Raes

Remerciements

Voici donc le moment de la rédaction des remerciements, pas une mince affaire ... Tellement de choses se bousculent dans nos têtes, on voit la fin d'une période enrichissante approchée et les sentiments de tristesse s'installent, car malgré que ces 10 mois de dur labeur n'aient pas été si faciles, je suis heureuse de d'avoir partagé cette expérience au sein du département de l'URBC.

Je souhaite, dans un premier temps, remercier le Professeur M. Raes de m'avoir guidé et éclairé tout au long de ce mémoire. Merci aussi à Damien, qui est parvenu à me supporter durant toute cette période, sans s'emballer. Sans sa bonne humeur, sa disponibilité, son aide, ses conseils, ... sans lui en gros, je n'en serai sans doute pas là. Je te remercie aussi pour ne t'être jamais énervé sur moi bien que parfois je le mérite, j'avoue ... mais aussi pour tes corrections en un temps éclair! Merci également à toute l'équipe Athéro, avec qui on se levait presque tous aux aurores pour assister aux réunions d'équipe.

Je remercie également les personnes qui ont partagé le même bureau que moi, à savoir Laura, Virginie, Jean-Yves et NICO. Sans eux, je n'aurais pas passé de moments de « décompresser » comme j'ai vécu. En effet, on aimait bien papoter et raconter des conneries, surtout moi en fait. Je ne comprends pas pourquoi ils me qualifiaient de bavard, je ne fais pas de bruit pour rien, je n'émet aucune parole pour ne rien dire, je suis assez calme je trouve, enfin ... c'est mon avis (heureusement les bureaux voisins ne se sont pas trop plaints)! Merci aussi à toi Laura, on a appris à se connaître et se supporter l'une l'autre, ... je pense avoir trouvé une amie en toi ;-). Mais je remercie particulièrement mon chéri (c'est qui ???), avec qui j'avoue j'ai passé le plus clair de mon temps, labo et hors labo ;-), avec qui les moments difficiles me paraissaient plutôt agréables.

Je ne saurai, non plus, passé à côté des deux Guillaume qui n'hésitaient pas à m'ennuyer et à me taquiner. Parfois ça ne me plaisait pas mais j'en redemandais (je ne suis pas une fille pour rien ;-)). Les gars, c'est bon vous êtes débarrassés de moi !!! Je pense qu'une fille aussi « casse-bonbon » que moi, ça ne se fabrique plus ...

Je tiens également à remercier ma famille, et surtout mes parents adorés qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ce mémoire. Ils m'ont permis de reprendre confiance et de retrouver le sourire dans les moments les plus difficiles. Je n'oublie pas non plus mes amis qui ont su me prendre en charge afin de décompresser un maximum lorsque la pression devenait insurmontable.

Merci également au personnel de l'URBC, et plus particulièrement Antoine et Guy, avec qui je prenais un malin plaisir à les ennuyer. Merci aussi à Martine de piquer des crises de nerfs et de crier au milieu du labo pour partager son mécontentement (c'était bien drôle).

Merci aussi aux autres mémorants et chercheurs du labo.

J'espère n'avoir oublié personne, dans tous les cas, merci à l'URBC de m'avoir accueillie dans son département.

Liste des abréviations

ABCA1 : ATP-binding cassette transporter A1

ACAT : Acyl cholestérol-acyl transférase

Akt : Serine/threonine protein kinase Akt

AP-1 : Activator protein-1

ApoA-I : Apo-protéine A-I

ApoB100 : Apo-protéine B100

ApoC : Apo-protéine C

ApoE : Apo-protéine E

ARE : Antioxidant response element

ATF-4 : Activating transcription factor 4

ATF-6 : Activating transcription factor 6

AVC : Accident vasculaire cérébral

BH₄ : Tétrahydrobioptérine

CAT : Catalase

CD36 : Cluster of differentiation 36

CE : Ester de cholestérol

CETP : Cholesterol ester transfer protein

CHOP : C/EBP homologous protein

cGMP : Guanosine monophosphate cyclique

CK2 : Caséine kinase 2

CO : Monoxyde de carbone

COX : Cyclooxygénase

eNOS : Endothelial NO synthase

ERK 1/ 2 : Extracellular signal-regulated kinase 1/ 2

ERSE : ER stress element

ET-1 : Endothelin-1

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FMN : Flavine mononucléotide

FOXO : Forkhead box O

GCL : Glutamate cystein ligase

GPx : Gluthathione peroxidase

Grp78 : 78 kDa glucose-regulated protein

GST : Gluthatione S-transférase

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HDL : High density lipoprotein

HL : Hepatic lipase

HMG Co-A réductase : Hydroxy-Méthyl-

Glutaryl- Coenzyme-A réductase

hmx-1 : gène codant pour l'hème oxygénase-1

hmx-2 : gène codant pour l'hème oxygénase-2

HO-1 : Hème oxygénase-1

HO-2 : Hème oxygénase-2

HO-3 : Hème oxygénase-3

HOCl : Acide hypochloreux

ICAM-1 : Intracellular cell adhesion molecule-1

IDL : Intermediate density lipoproteins

IKK : IκB kinase

IL-1 : Interleukine-1

IL-6 : Interleukine-6

IL-8 : Interleukine-8

IFN-γ : Interféron-γ

IRE-1 : Inositol requiring 1

JAM-1 : Junctional adhesion molecule-1

JNK : c-Jun NH₂-terminal Kinase

KEAP-1 : Kelch-like ECH-associated protein 1 (ou INrf2)

LCAT : Lécithine :cholesterol acyltransférase

LDL : Low density lipoprotein

LDLR : Low density lipoprotein receptor

LOX : Lipoxygénase

LOX-1 : Lectine-like oxidized low density lipoprotein receptor-1

LPL : Lipoprotéine lipase

LXR : Liver X receptor

M-CSF : Macrophage colony stimulating factor

Maf : Maf protein

MAPK : Mitogen activated protein kinase

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1

MMP : Matrix metalloproteinase

MoxLDL : LDL oxydées à la MPO

MPO : Myéloperoxydase

NAC : N-acétyl cystéine

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NAD(P)H oxydase : Nicotinamide adénine dinucléotide (Phosphate) oxydase

NFκB : Nuclear factor kappa-B

NO : Oxyde nitrique

NQO1 : NAD(P)H quinone
oxydoréductase
Nrf1 : Nuclear factor (erythroid-derived
1)-like
Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived
2)-like
Nrf3 : Nuclear factor (erythroid-derived
3)-like

$O_2^{\cdot -}$: Anion superoxyde
ONOO⁻ : Peroxynitrite
OxLDL : LDL oxydées au sulfate de
cuivre

PECAM-1 : Platelet adhesion molecule-1
PERK : RNA-dependent protein kinase-
like ER kinase
PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase
PKA : Protein kinase A
PKC : Protein kinase C
PLTP : Phospholipid transfer protein
PON-1 : Paraoxonase-1
PPAR : Peroxisome proliferator-activated
receptor
PTX3 : Pentraxine 3

Redox : Oxydation-réduction
RE : Réticulum Endoplasmique
RNS : Reactive nitrogen species
ROS : Reactive oxygen species
RXR : Retinoid X receptor

sGC : Guanylate cyclase soluble
SMC : Smooth Muscle Cell
SOD : Superoxyde dismutase
SR-A : Macrophage Scavenger Receptor 1
SR-B1 : Scavenger receptor class B-1
SRE : Sterol regulatory element
SREBP : Sterol regulatory element-
binding protein
SREC-1 : Class F scavenger receptor 1

TGF- β : Transforming growth factor β
TNF- α : Tumor necrosis factor α
TRAF2 : TNF receptor-associated factor 2

UPR : Unfolded protein response
UPRE : Unfolded protein response
element

VCAM-1 : Vascular cell adhesion
molecule-1
VEGF : Vascular endothelium growth
factor
VLDL : Very low-density lipoprotein
VSMC : Vascular smooth muscular cell

XBP-1 : X-box binding protein 1
XOR : Xanthine oxydo-reductase

Table des matières

<u>I. Introduction</u>	<u>1</u>
1. Anatomopathologie de l'athérosclérose	1
1.1. Généralités	1
1.2. Evolution morphologique de l'athérome	1
1.2.1. Initiation de la lésion	2
1.2.2. Formation de la plaque fibreuse	2
1.2.3. Evolution, complications de la lésion et conséquences	3
1.3. Facteurs de risque	4
2. Acteurs moléculaires et cellulaires principaux de l'athérogenèse	5
2.1. Le cholestérol	5
2.1.1. Le concept de lipoprotéine	6
2.1.2. Structure et classification des lipoprotéines	6
2.1.3. Métabolisme des lipoprotéines	7
2.2. Contexte inflammatoire	8
2.3. Dysfonctionnement endothélial	9
3. Stress oxydatifs et modifications oxydatives des LDL	11
3.1. Sources majeures de ROS	11
3.2. Modèles d'oxydation <i>in vitro et in vivo</i>	14
3.3. Récepteurs aux LDL oxydées	15
4. Voies de signalisation activées par le stress oxydatif	16
4.1.1. Voie Nrf2	16
4.1.2. Principaux gènes cibles de Nrf2	18
4.1.3. Les hèmes oxygénases	18
4.2. La voie AP-1 (Activator protein-1)	20
4.3. La voie NFκB (Nuclear factor κ of B cells)	20
4.4. La voie UPR (Unfolded protein response)	21
4.4.1. PERK (RNA-dependent protein kinase-like ER kinase)	22
4.4.2. ATF-6 (Activating Transcription Factor 6)	22
4.4.3. IRE1 (Inositol Requiring 1)	22
5. Objectifs du mémoire	23
<u>II. Matériels et méthodes</u>	<u>25</u>
1. Lignée cellulaire	25
1.1. Type cellulaire	25
1.2. Culture cellulaire	25
1.3. Repiquage cellulaire	25
1.3.1. Matériels (tableau II-1)	25
1.3.2. Méthode	25
2. Lipoprotéines	25
2.1. Isolation	25
2.1.1. Matériels et réactifs (tableau II-2)	25
2.1.2. Méthode	25
2.2. Modification des LDL au sulfate de cuivre (OxLDL)	26
2.2.1. Réactifs (tableau II-3)	26
2.2.2. Méthode	26
2.3. Modification des LDL à la myéloperoxydase (MPO) (MoxLDL)	26
2.3.1. Réactifs (tableau II-3)	26
2.3.2. Méthode	26
2.4. Dosage des LDL par la méthode de Lowry	26
2.4.1. Matériels et réactifs (tableau II-4)	26
2.4.2. Méthode	26
2.5. Stimulation des cellules EAhy926 par les LDL	26

2.6.	Migration des LDL sur gel d'agarose	27
2.6.1.	Principe	27
2.6.2.	Matériels et réactifs (tableau II-5)	27
2.6.3.	Méthode	27
3.	Condition statique	27
3.1.	Mesure de la production d'Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène (ROS)	27
3.1.1.	Principe	27
3.1.2.	Matériels et réactifs (tableau II-6)	27
3.1.3.	Méthode	27
3.2.	Dosage de protéines par la méthode de Pierce	28
3.2.1.	Matériels et réactifs (tableau II-7)	28
3.2.2.	Méthode	28
3.3.	Mesure de l'activité transactivatrice de facteurs de transcription par transfection des cellules EAhy926 avec un plasmide rapporteur	28
3.3.1.	Principe	28
3.3.2.	Matériels et réactifs (tableau II-8)	28
3.3.3.	Méthode	28
3.4.	Invalidation de Nrf2 par RNA interférence	29
3.4.1.	Matériels et réactifs (tableau II- 9)	29
3.4.2.	Méthode	29
3.5.	RT-PCR quantitative	29
3.5.1.	Matériels et réactifs (tableau II- 10)	29
3.5.2.	Méthode	29
3.5.2.1.	Extraction d'ARN totaux	29
(a)	L'extraction au Trizol	29
(b)	L'extraction au QIAcube	29
3.5.2.2.	Transcription inverse	30
3.5.2.3.	RT-PCR quantitative	30
3.5.2.4.	Analyse des résultats	30
3.6.	Western blot	30
3.6.1.	Matériels et réactifs (tableaux II-12/13)	30
3.6.2.	Méthode	30
3.6.2.1.	Extraction protéique totale	30
3.6.2.2.	Extraction Nucléaire	31
3.6.2.3.	Western blot	31
3.7.	Autres Réactifs (tableau II-14)	32
3.8.	Tests statistiques	32

III. Résultats **33**

Etude de la réponse des cellules endothéliales EAhy926 suite à une stimulation avec des LDL **33**

1.	Caractérisation de la génération d'un stress oxydatif intracellulaire dans les cellules EAhy926 stimulées avec des LDL modifiées	33
2.	Caractérisation des voies de signalisation activées en réponse à une stimulation avec des LDL dans les cellules EAhy926	34
2.1.	Etude de l'effet des LDL sur l'activité transactivatrice de facteurs de transcription redox-sensibles dans les cellules EAhy926	34
2.1.1.	AP-1	34
2.1.2.	NFκB	34
2.1.3.	Nrf2	34
2.2.	Etude de l'effet des LDL sur la voie Nrf2	35
2.2.1.	Etude de l'effet des LDL sur la translocation nucléaire de Nrf2	35
2.2.2.	Etude de l'effet des LDL sur l'expression d'un gène cible de Nrf2, <i>hmx-1</i>	36
2.2.2.1.	Les LDL modifiées induisent une surexpression de <i>hmx-1</i> au niveau ARNm	36
2.2.2.2.	Les LDL modifiées induisent une augmentation de l'abondance protéique d'HO-1	36
2.2.2.3.	La présence d'un antioxydant, le Trolox, n'a aucun effet sur la surexpression de <i>hmx-1</i> induite par les LDL modifiées	37
2.2.3.	Etude de l'invalidation de Nrf2 sur la surexpression d' <i>hmx-1</i> induite par les LDL modifiées	37

2.3.	Recherche de mécanismes explicatifs pour les effets différentiels Ox/Mox LDL	38
2.3.1.	Etude de la stabilité du messenger <i>hmox-1</i>	38
2.3.2.	Etude de la voie UPR	38
2.3.3.	Etude des effets d'inhibiteurs de kinases sur l'activation de la voie Nrf2	39

IV. Discussion, perspectives et conclusion **42**

V. Bibliographie **50**

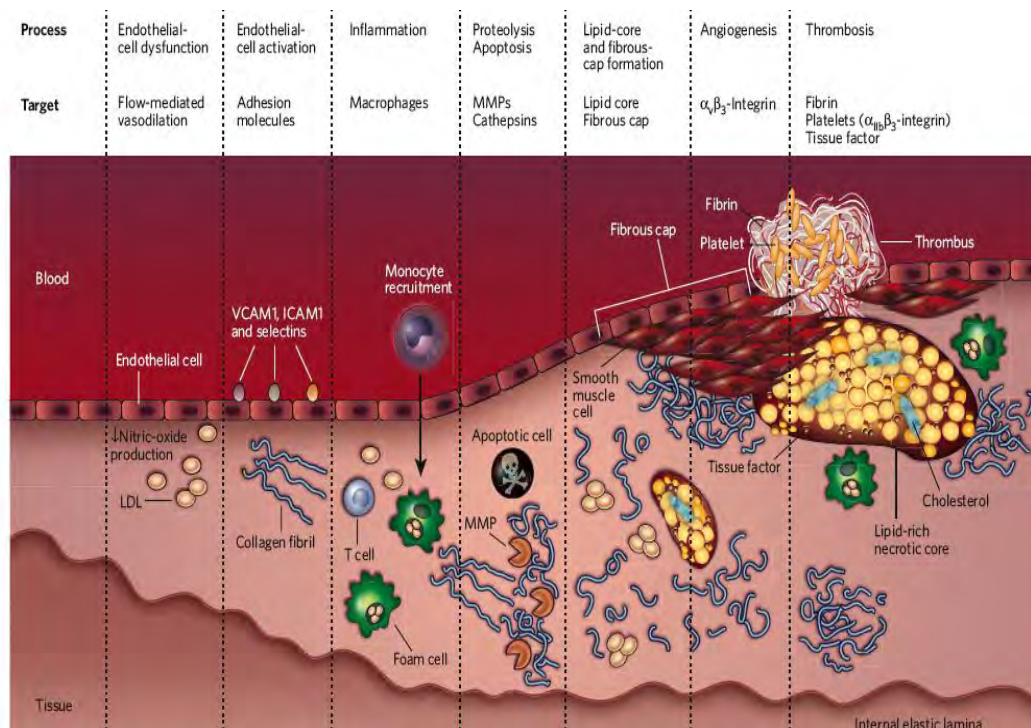


Figure I-1: Schéma du processus de développement de l'athérosclérose. Le processus séquentiel de développement de l'athérome se déroule en plusieurs étapes, ici simplifiées. Suite à la présence de facteurs de risque, des LDL de la média peuvent traverser l'endothélium qui sera activé et qui synthétisera des molécules favorisant son dysfonctionnement et permettant l'accumulation de molécules inflammatoires dans l'intima. Les LDL peuvent subir des modifications et être captées par les macrophages afin de former des cellules spumeuses, gorgées de lipides. Ces cellules spumeuses vont s'agréger et former une plaque qui va petit à petit diminuer le diamètre du vaisseau et pouvoir se rompre à tout moment si la chape fibreuse, formée par les éléments synthétisés à partir des cellules musculaires lisses de la média, n'est pas stable. Si la plaque se rompt, un thrombus peut apparaître et obstruer la lumière vasculaire qui conduira à diverses conséquences pathologiques comme l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral, ... (Sanz and Fayad 2008)

I. Introduction

1. Anatomopathologie de l'athérosclérose

1.1. Généralités

A l'heure actuelle, les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux apparaissent comme les principales causes de mortalité dans les pays occidentalisés et s'étendent, de nos jours, au monde entier. En effet, l'athérosclérose représente la première cause de mortalité (Singh, Mengi et al. 2002). De plus, certaines recherches prévoient que ces pathologies resteraient les plus importantes pour les 20 années à venir (Pepine 2001; Mathers and Loncar 2006). La plupart des pathologies artérielles sont la traduction clinique de l'athérosclérose, un processus pathologique progressif ne résultant pas simplement d'une dégénérescence inévitable due à l'âge des artères, mais également d'une inflammation chronique. Le mot athérosclérose a été proposé en 1904 par Felix Marchand à partir d'une étymologie déterminant bien sa composition : *atheroma* « kyste rempli de matière grasseuse » et *skleros* « dur ». Cette pathologie se caractérise essentiellement par l'accumulation de lipides, principalement issus des LDL, ainsi que de protéines, de glucides complexes, de produits sanguins, de tissu fibreux, ... au niveau de la tunique la plus interne (ou intima) des artères de gros et de moyen calibres, telles que l'aorte, les coronaires et les carotides. Cette accumulation conduit à la formation d'une lésion nommée « athérome » caractérisée par la présence de cellules spumeuses résultant de l'internalisation excessive de lipoprotéines de faible densité (LDL) par des macrophages dérivés de monocytes. Cet épaississement de l'intima va, par la suite, progressivement réduire la lumière de l'artère et l'obstruer, perturbant la circulation sanguine. La plaque athéromateuse peut alors, à tout moment, se rompre et provoquer une thrombose ou induire d'autres complications. Le processus de développement de l'athérosclérose est repris en Figure I.1.

1.2. Evolution morphologique de l'athérome

Une lésion athéromateuse peut apparaître dès le jeune âge, sans symptôme apparent et, par la suite, continuer à se développer, se compliquer et provoquer des conséquences graves voire dramatiques, telle la rupture de la plaque conduisant à une thrombose ralentissant ou bloquant totalement le flux sanguin, ou encore une dilatation artérielle compensatoire accompagnée d'une altération de la paroi vasculaire résultant en un anévrisme qui peut également se rompre, provoquant une hémorragie interne (Léoni 2001). Les complications les plus souvent observées lors de cette pathologie sont principalement l'infarctus du myocarde dû à une thrombose au niveau d'une artère coronaire ou l'accident vasculaire cérébral (AVC) où la thrombose se situe au niveau d'une artère irriguant le cerveau.

Certaines régions vasculaires semblent prédisposées à la formation de lésions athéromateuses. Les sites préférentiels de formation de lésions se situent au niveau des bifurcations artérielles. Cette localisation est souvent fortement liée aux conditions de flux auxquelles sont soumises l'endothélium dans ces régions. En effet, on retrouve à ces endroits des forces de cisaillement plus faibles, qualifiées d'athérogènes (Hahn and Schwartz 2008; Mestas and Ley 2008).

La lésion primaire nommée strie lipidique ou « fatty steak » est la première lésion visible macroscopiquement. Son évolution en plaque fibreuse est lente et peut même prendre des années. Une classification anatomique des lésions de type I à IV a été proposée par l'American Heart Association, tenant compte de leur progression en fonction de l'accumulation de lipides et de leur composition tissulaire (Tableau I-1). La **lésion de type I** est caractérisée par l'accumulation de lipoprotéines athérogènes et par l'infiltration de

	Lesion Type	Cellular Composition
I	Initial change	Isolated macrophage foam cells
II	Minimal change	Multiple layers of foam cells
	IIa: Progression prone; Abundant SMCs	Few lymphocytes
	IIb: Progression resistant; Few SMCs	Isolated mast cells
III	Preatheroma	Isolated pools of densely packed extracellular lipids
		SMCs accumulate lipid droplets
IV	Atheroma	Confluent core of extracellular lipids
		Increased No. of lymphocytes
		SMCs decrease in number, remaining SMCs have thick basement membranes
V	Fibroatheroma	Fibrous tissue and collagen added
		Intimal SMCs increase in number
VI	Hemorrhagic/thrombotic lesion	Lesion becomes fissured and/or thrombotic
VII	Calcific lesion	Calcification predominates
VIII	Fibrotic lesion	Fibrous tissue changes predominate
		Lipid core is nearly absent

Tableau I-1: Classification anatomique en fonction de la progression des lésions athéromateuses proposées par l'American Heart Association. Selon une classification histologique, les lésions sont désignées par des chiffres romains indiquant la progression et la composition de la lésion (Doran, Meller et al. 2008).

leucocytes. La **lésion de type II** est composée de couches de macrophages et de cellules spumeuses accompagnées de cellules musculaires lisses (CML) ayant migré de la média vers l'intima. Cette lésion est plus communément désignée par le nom de strie lipidique. La **lésion de type III** est la lésion intermédiaire entre les lésions de types II et IV où l'intégrité des CML est altérée. Les **lésions de type IV** sont caractérisées par un large cœur de lipides extracellulaires tandis que la **lésion de type V** présente la même structure histologique, mais coiffée par une chape fibreuse. Les lésions de type V se subdivisent en deux classes, les **sous-types Vb et Vc**. Le **sous-type Vb** correspond à des lésions largement calcifiées, tandis que le **sous-type Vc** désigne les lésions contenant plus de tissus fibreux, peu de lipides et pas de calcium. Le dernier type, la **lésion de type VI**, représente les plaques rompues accompagnées de thrombus dans la lumière artérielle (Singh, Mengi et al. 2002).

Ce processus progressif et de longue durée se déroule donc en 4 étapes : l'initiation de la lésion, la formation de la strie lipidique, l'évolution de la plaque et éventuellement sa rupture. Comme souligné par Peter Libby (Libby 2007), ces étapes sont toutes, du début à la fin, favorisées par un contexte inflammatoire.

1.2.1. Initiation de la lésion

L'endothélium vasculaire forme une barrière sélective entre le sang et les tissus et constitue un organe endocrine multifonctionnel capable, en conditions physiologiques, de réguler la tension vasculaire entre autres via la production de NO, la synthèse et composition de la matrice subendothéliale, l'équilibre anti/prothrombotique, la prolifération des cellules musculaires lisses, la perméabilité aux lipoprotéines ainsi qu'aux protéines du plasma,... Avec le temps et en fonction des facteurs de risque présents, l'endothélium peut devenir dysfonctionnel et se fragiliser, ce qui augmente sa perméabilité et permet ainsi le passage accru de macromolécules telles que les LDL à travers les jonctions endothéliales. L'accumulation de LDL dans l'intima les met en contact avec la matrice extracellulaire et plus précisément avec des protéoglycanes favorisant leur rétention dans l'espace subendothélial (Lusis 2000). Les LDL vont progressivement subir des modifications dont des oxydations, des lipolyses, des agrégations, ... suite à l'action de certains oxydants ou enzymes hydrolytiques. Ces modifications intensifient le processus inflammatoire, mais favorisent aussi la formation de cellules spumeuses via la rétention des LDL au sein de la paroi vasculaire (Badimon, Vilahur et al. 2009). Cependant, les lipoprotéines de haute densité (HDL) semblent jouer un rôle plutôt protecteur dans l'athérosclérose. En effet, ces particules contribuent à éliminer l'excès de cholestérol des tissus périphériques et protègent les LDL de l'oxydation. Les HDL possèdent des propriétés anti-oxydantes grâce à la paraoxonase-1 (PON1), une estérase portée par les HDL prévenant l'oxydation des LDL et neutralisant les phospholipides oxydés, s'opposant ainsi au développement de l'athérome. (Lusis 2000).

Il semble qu'un contexte inflammatoire local favorise l'initiation et la progression de la lésion. Suite à la présence de lipides dans l'intima et plus particulièrement des formes modifiées comme les LDL oxydées, les cellules endothéliales sont activées et surexpriment des protéines pro-inflammatoires comme des interleukines, chémokines ou des molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1 et E/P-sélectines) permettant le recrutement de monocytes et de lymphocytes au site d'inflammation. Ces cellules immunitaires sont donc recrutées grâce à l'expression de sélectines et de ligands d'intégrines leucocytaires, permettant à ces cellules de rouler sur la surface de l'endothélium, d'y adhérer afin de s'infiltrer par diapédèse dans l'intima à travers les jonctions intercellulaires et voire parfois à travers les cellules endothéliales elles-mêmes (Lusis 2000; Bobryshev 2006; Mestas and Ley 2008).

1.2.2. Formation de la plaque fibreuse

Les monocytes, une fois entrés dans l'espace sous-endothélial, prolifèrent, se différencient en macrophages grâce à un facteur de régulation, le M-CSF (macrophage colony stimulating

factor), mais peuvent aussi se différencier en cellules dendritiques. Ces macrophages auront la capacité d'internaliser les LDL oxydées, et ainsi de se transformer en cellules spumeuses par l'intermédiaire de récepteurs de la famille « scavenger », dont les récepteurs SR-A et CD36 essentiellement (voir Paragraphe 3.3). Ces récepteurs, contrairement aux récepteurs aux LDL natives, ne sont pas soumis à une régulation négative par le cholestérol et permettent dès lors une accumulation intracellulaire des LDL aboutissant à la formation des cellules spumeuses. Celles-ci, caractéristiques des lésions athéromateuses, sécrètent aussi des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance, des interférons, des métalloprotéinases et produisent des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS), maintenant le contexte inflammatoire et le recrutement d'autres monocytes circulants (Spagnoli, Bonanno et al. 2007). Les cellules spumeuses s'accumulent donc dans l'intima et finissent par former un agrégat à l'origine de l'athérome (Badimon, Vilahur et al. 2009). Ces cellules spumeuses présentes au centre de la plaque peuvent aussi mourir par divers processus de mort, dont la nécrose, l'apoptose, l'autophagie, dus à la présence excessive de LDL oxydées qui finissent par endommager la cellule. La libération du contenu des cellules via ces processus participe également à un accroissement de l'inflammation via la libération de nombreux médiateurs pro-inflammatoires.

Certaines cytokines et facteurs de croissance sécrétés par les macrophages et les lymphocytes T jouent un rôle important dans la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima, leur prolifération et la production d'une matrice extracellulaire par ces cellules. En effet, des cellules musculaires de la média peuvent migrer vers l'intima, exprimer des récepteurs « scavenger » comme les macrophages et ainsi internaliser les LDL oxydées, ou synthétiser une matrice extracellulaire, contribuant à la chape fibreuse qui joue un rôle clé dans la stabilité de la plaque d'athérome. Les cellules musculaires lisses vasculaires peuvent synthétiser des composants de la matrice extracellulaire comme du collagène, des protéoglycanes, mais peuvent aussi synthétiser des enzymes dont des métalloprotéinases également exprimées par les macrophages et les cellules endothéliales, induisant un amincissement de cette chape fibreuse (Lusis 2000; Shah 2003). De cette manière, l'épaisseur de la chape dépend du rapport entre la synthèse et la dégradation de cette matrice extracellulaire. La solidité de la chape est critique pour la stabilité des lésions et réduit les risques de rupture (voir Paragraphe suivant).

1.2.3. Evolution, complications de la lésion et conséquences

Les manifestations cliniques de l'athérosclérose sont liées à l'augmentation de volume de l'athérome provoquant la diminution de la lumière artérielle qui va gêner de plus en plus la circulation sanguine. Il en résulte une augmentation de la pression artérielle qui peut conduire à une rupture de la plaque en fonction de la vulnérabilité de celle-ci et provoquer divers dégâts selon l'artère touchée.

Le phénotype de plaque vulnérable montre un large cœur lipidique, occupant environ 30 à 40 % du volume de la plaque, composé de cristaux de cholestérol libre, d'esters de cholestérol et de lipides oxydés. On observe également un nombre important de cellules inflammatoires infiltrées ainsi qu'une néo-vascularisation de la plaque. De plus, la présence d'une chape fibreuse de fine épaisseur est la cause générale de la rupture de la plaque. En effet, suite à un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire en faveur de la dégradation, on observe un taux plus faible de composants de cette matrice ainsi que de CMLs. Ces caractéristiques sont généralement considérées comme un signe de vulnérabilité et prédisposent les plaques à se rompre spontanément ou en réponse à des éléments hémodynamiques (Shah 2003; Shah 2009). En plus d'une synthèse moins importante, ces plaques présentent un taux plus élevé de dégradation de la matrice extracellulaire grâce à l'activité d'enzymes de la famille des « matrix-degrading

Factors with a strong genetic component	
Elevated levels of LDL/VLDL	Associations demonstrated in epidemiological studies and supported by studies of genetic disorders and animal models. Clinical trials have shown benefits of cholesterol reduction ²⁴ .
Reduced levels of HDL	Associations demonstrated by numerous epidemiological studies and supported by studies of genetic diseases and animal models ²⁸ .
Elevated levels of lipoprotein(a)	Associations observed in many, but not all, epidemiological studies. Animal studies have been contradictory ²⁹ .
Elevated blood pressure	Associations observed in epidemiological studies. Clinical trials have demonstrated benefits of blood pressure reduction, with particularly strong effects on stroke ^{34,60} .
Elevated levels of homocysteine	Associations have been observed in epidemiological studies, and homocystinuria results in severe occlusive vascular disease ⁴⁹ .
Family history	When all known risk factors are controlled for, family history remains a very significant independent factor ⁶ .
Diabetes and obesity	Associations observed in epidemiological studies and in studies with animal models ⁵⁴ .
Elevated levels of haemostatic factors	Significant independent associations have been observed with elevated levels of fibrinogen, plasminogen activator inhibitor type 1 and platelet reactivity ²⁴ .
Depression and other behavioural traits	Associations observed in several population studies ⁶¹ .
Gender (male)	Below age 60, men develop CHD at more than twice the rate of women ³⁸ .
Systemic inflammation	Elevated levels of inflammatory molecules such as C-reactive protein are associated with CHD, as are inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis ⁶² .
Metabolic syndrome	This cluster of metabolic disturbances, with insulin resistance as a central feature, is strongly associated with CHD ⁵ .
Environmental factors	
High-fat diet	Population migration and epidemiological studies indicate strong associations with lifestyle, and diet appears to be the most significant factor. High-fat, high-cholesterol diets are usually required for development of atherosclerosis in experimental animals ¹⁴ .
Smoking	Strong associations observed in numerous epidemiological studies. Clinical trials have demonstrated the benefit of stopping smoking ⁶⁴ .
Low antioxidant levels	Results of clinical trials with antioxidants have not been conclusive. Fat-soluble antioxidants protect against atherosclerosis in experimental animals, however ⁶⁵ .
Lack of exercise	Significant independent associations with CHD ⁶ .
Infectious agents	Epidemiological studies provide suggestive evidence for associations with various infectious agents, such as <i>Chlamydia pneumoniae</i> . Preliminary animal studies support the relationship ⁶⁴ .

Tableau I-2: Listes des différents facteurs de risque, génétiques ou environnementaux, pouvant conduire à une maladie cardiovasculaire (Lusis 2000).

metalloproteinases » (MMPs) ainsi que d'autres protéases dont les cathepsines. Ces enzymes, produites par les cellules inflammatoires mais aussi par les CMLs et les cellules endothéliales, dégradent tous les composants de la matrice extracellulaire (Shah 2009). Ces MMPs peuvent être activées et/ou induites par une série de facteurs comme la présence accrue de ROS, de LDL oxydées, de cytokines inflammatoires,... D'autres causes peuvent également être à l'origine de la rupture de plaque, telle une activité physique extrême ou encore l'utilisation abusive de drogues, ...

Cependant, dans environ 20-40 % des cas de thromboses coronariennes, il n'apparaît aucune rupture de la plaque mais plutôt une érosion de celle-ci. Dans ces plaques, une chape fibreuse plus importante et un cœur lipidique réduit sont visibles contrairement aux plaques vulnérables. De plus, ces plaques érosives possèdent une prévalence inflammatoire moindre. La thrombose, semble déclenchée par l'augmentation d'un état thrombotique systémique accompagnée d'une augmentation de l'agrégation plaquettaire et d'une diminution de la fibrinolyse. De plus, cet état thrombotique est favorisé par les leucocytes en augmentant la concentration en facteur tissulaire ou par des déficiences en molécules anti-thrombotiques comme la thrombomoduline et le récepteur à la CRP (C-Reactive protein) (Shah 2003; Shah 2009).

Des recherches ont également montré qu'en agissant sur les facteurs de risque, on pouvait réduire la formation ou ralentir la progression d'une lésion, voire diminuer celle-ci. Ces modifications changeraient peu la taille de la plaque, mais pourraient réduire la probabilité de rupture de la plaque et de thrombose par changement du phénotype et de la composition de la plaque conduisant ainsi à un phénomène de stabilisation. Des changements de composition de la plaque ont été observés sur des animaux chez lesquels la diminution de la quantité de lipides par l'alimentation, l'administration de statines ou d'ApoA-I et de HDL conduisaient à une réduction du cœur lipidique ainsi que de la réaction inflammatoire et de l'activation et de la production de MMPs, mais aussi à l'augmentation de production de collagène. En effet, en diminuant les lipides et l'inflammation via divers mécanismes, la plaque devient plus stable et on réduit le risque de rupture de la plaque (Shah 2009).

1.3. Facteurs de risque

De nombreux facteurs de risque pouvant induire une détérioration de la fonction vasculaire, sont associés au développement des maladies cardiovasculaires (CVD). Ces facteurs sont classés en deux catégories : les facteurs fixes et les facteurs modifiables. Parmi les facteurs de risques fixes, nous retrouvons des facteurs inévitables comme le sexe, l'âge, ou les caractéristiques génétiques comme l'hypercholestérolémie familiale (liée à un déficit du récepteur aux LDL natives), la maladie de Tangier (trouble récessif rare caractérisé par l'absence de HDL circulants). Les facteurs modifiables quant à eux regroupent une série de facteurs d'origines diverses en corrélation avec le mode de vie tels que l'alimentation, le tabagisme, l'inactivité physique et la sédentarité ou encore des facteurs en combinaison avec d'autres pathologies comme les dyslipidémies, l'obésité, le diabète, l'hypertension (Lusis 2000; Fearon and Faux 2009). La liste des différents facteurs de risque favorisant l'athérosclérose est reprise au Tableau I-2.

Le **sexe** entre en ligne de compte car l'athérosclérose atteint davantage la population masculine. En effet, les femmes sont protégées jusqu'à la ménopause grâce à la présence accrue d'œstrogènes.

L'**âge** est aussi un facteur de risque et on recense plus de cas de maladies cardiovasculaires dans une population vieillissante que dans une population jeune. Les pathologies vasculaires liées à l'âge résultent probablement d'un effet cumulatif de stress oxydatifs, conduisant à

Cholestérolémie	Incidence d'infarctus et de mort cardiaque (‰)	Risque relatif
< 1,94	42,3	1
1,94 → 2,18	58,7	1,4
2,18 → 2,39	87,4	2,1
2,40 → 2,70	110,0	2,6
> 2,70	154,4	3,7

Tableau I-3: Risque relatif de maladies coronariennes en fonction de la cholestérolémie
(<http://www.sante.ujf-grenoble.fr/sante/CardioCD/cardio/chapitre/412.htm>).

Cholestérol	≤ 2 g/l
Triglycérides	≤ 1,25 g/l
Apo B	≤ 1 g/l
LDL	≤ 1,20 g/l
Apo A1	≥ 1,20 g/l
HDL	≥ 0,45 g/l

Tableau I-4: Taux sanguins recommandés
(<http://www.sante.ujf-grenoble.fr/sante/CardioCD/cardio/chapitre/412.htm>).

Risque de morbidité coronarienne par rapport à la moyenne de l'ensemble de la population selon les différents facteurs de risque d'après Framingham						
Cholestérol	Taux	< 2.00	2.00 à 2.19	2.20 à 2.39	2.40 à 2.59	> 2.60
	Risque	0.49	0.70	0.80	1.37	1.92
Tabac	Consommation (cigarettes/j)	0	< 20	> 20		
	Risque	0.69	1.26	1.58		
Pression artérielle systolique	Niveau (mmHg)	< 120	120-139	140-159	160-179	> 179
	Risque	0.45	0.43	1.03	1.58	1.78
Obésité	Surpoids	< 10%	0	> 10 %	> 30%	
	Risque	0.51	0.81	1.3	2.41	
Cumul des facteurs de risque	Nombres positifs	0	1	2	3	
	Risque	0.6	1.12	2.01	6.34	

Tableau I-5: Risques encourus en fonction des facteurs de risque et du cumul de ces facteurs
(<http://t.verson.free.fr/REEDUCATION-CARDIO-VASCULAIRE/Pathologies.htm>).

l'inflammation et à une dysfonction endothéliale. Cependant aucun mécanisme précis n'a été actuellement identifié (Najjar, Scuteri et al. 2005; Collins, Lyon et al. 2009). L'excès calorique par contre conduit à l'obésité favorisant la résistance à l'insuline, le syndrome métabolique et le diabète, facteurs fréquemment associés à l'âge et contribuant à l'accélération de l'athérosclérose (Collins, Lyon et al. 2009).

L'**obésité**, maladie liée à la « mal bouffe » et la plus commune des pays industrialisés, est associée aux maladies cardiovasculaires. Cette maladie chronique, multifactorielle et complexe résulte d'une interaction entre différents facteurs génétiques et environnementaux. De plus, récemment il a été suggéré que l'obésité était associée à une inflammation chronique de faible intensité (Wang and Nakayama 2010). Le tissu adipeux n'est pas simplement un lieu de stockage des graisses, mais également un organe endocrine actif jouant de nombreux rôles dont sa contribution dans les processus inflammatoires en cas d'obésité. De cette façon, des taux anormaux de métabolites comme les lipides, les acides gras et les cytokines du tissu adipeux, activent les monocytes et augmentent la sécrétion de cytokines inflammatoires dont la leptine, l'interleukine 1 et 6, ...

L'**hypercholestérolémie** et essentiellement des concentrations élevées de lipoprotéines de faible densité (LDL) dans le plasma représentent un des principaux facteurs de risque de l'athérosclérose (Badimon, Vilahur et al. 2009). Ainsi, des taux supérieurs à 1.60 g/l sont considérés comme à risque. Le risque relatif de maladie cardiovasculaire encouru en fonction du taux de cholestérolémie et les taux sanguins recommandés sont repris dans les Tableaux I-3 et I-4.

Quelle que soit l'origine de ces facteurs de risque, ceux-ci contribuent au développement et à la progression de l'athérosclérose en favorisant un contexte pro-inflammatoire et pro-oxydant, en majeure partie. Ces conditions pro-inflammatoires et de stress oxydatif induisent des dysfonctionnements au niveau de l'endothélium, des monocytes, des cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que des dommages mitochondriaux qui à leur tour favorisent la génération de ROS, renforçant les conditions pro-oxydantes. Enfin, soulignons qu'au plus les facteurs de risque sont nombreux, au plus la probabilité de développer des athéromes et des problèmes cardio-vasculaires est grande. Un tableau montrant les risques relatifs encourus en fonction des facteurs de risque est repris en Tableau I-5.

2. Acteurs moléculaires et cellulaires principaux de l'athérogenèse

2.1. Le cholestérol

Le cholestérol est une molécule stéroïdienne amphipatique essentielle pour de nombreuses fonctions comme par exemple le maintien de la membrane cellulaire, ou en tant que précurseur dans la synthèse d'hormones et des sels biliaires.

Chez l'homme, le cholestérol circulant est principalement d'origine endogène. Cependant, le taux de synthèse est modulable par certains facteurs exogènes tels que l'alimentation, en particulier la composition en acides gras des divers aliments. En effet, environ 30 % du cholestérol circulant est d'origine exogène, lié à l'alimentation, la composition des graisses consommées intervenant plus que la quantité ingérée.

La synthèse du cholestérol, possible dans toutes les cellules, est surtout active dans les hépatocytes et les entérocytes. La synthèse de cholestérol, entièrement cytoplasmique, se fait à partir de l'acétyl Co-A provenant des mitochondries. L'Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme-A réductase (HMG Co-A réductase) est l'enzyme qui régule la synthèse du cholestérol et dont l'activité varie en fonction de la concentration intracytoplasmique en

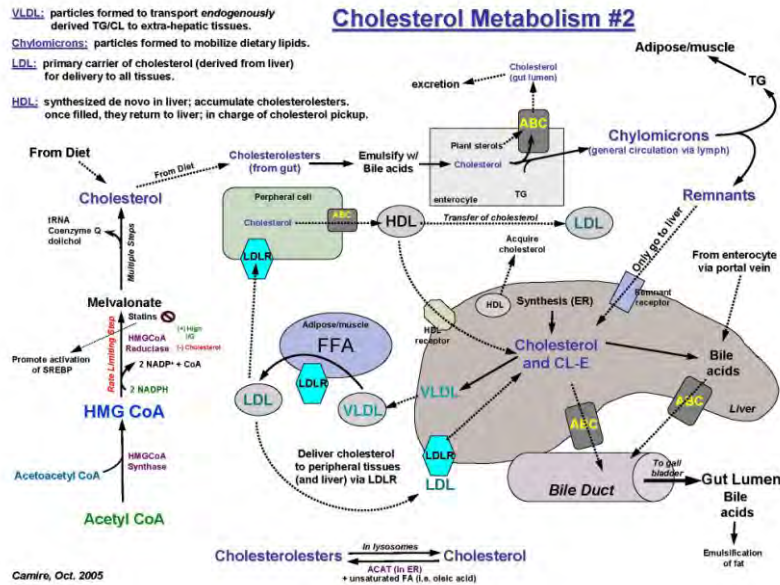


Figure I-2: Synthèse et métabolisme du cholestérol. Le cholestérol peut être soit d'origine endogène, suite à sa synthèse en plusieurs étapes à partir de l'acétyl CoA, soit d'origine exogène via l'alimentation. Les lipides alimentaires sont émulsifiés au niveau du duodénum par les sels biliaires et sont absorbés dans les entérocytes dans lesquels ils s'associent à des apoprotéines pour constituer les chylomicrons natifs qui passent dans la lymphe puis dans le sang. Dans la circulation les chylomicrons sont rapidement épurés d'une grande partie de leurs triglycérides par la lipoprotéine lipase et deviennent des particules résiduelles, appelées « remnants » de chylomicrons, rapidement fixés par le foie grâce à un récepteur spécifique. Le foie réexporte les triglycérides sous forme de VLDL. Hors périodes digestives, les VLDL d'origine hépatique remplacent les chylomicrons. Ces molécules quittent le foie et se transforment progressivement en IDL puis LDL, suite à l'accroissement de la capture en cholestérol. Les LDL circulantes délivrent ainsi le cholestérol aux cellules des tissus périphériques et au foie.

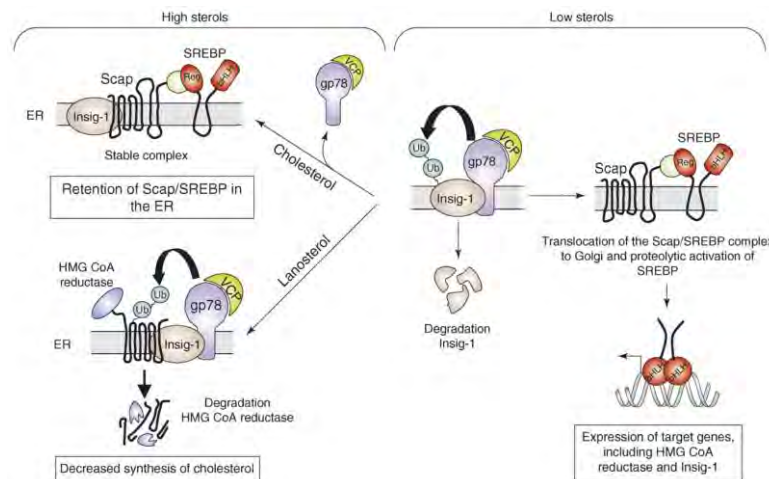


Figure I-3: Mode d'action du facteur de transcription SREBP. En absence de cholestérol, Insig-1 interagissant avec gp78, est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome, ce qui libère le complexe Scap/SREBP qui est transloqué de la membrane du réticulum endoplasmique dans le Golgi. Dans le Golgi, SREBP subit 2 clivages libérant le facteur SREBP actif. Celui-ci est transloqué dans le noyau, se dimérise et peut alors induire la transcription des gènes codant pour la HMG CoA réductase et Insig-1. Lorsque le taux de cholestérol augmente, le cholestérol se lie à Scap, permettant l'interaction du complexe Scap/SREBP avec Insig-1. Cet état provoque la rétention du complexe Scap/SREBP au niveau du RE et maintient SREBP sous une forme inactive (Bengoechea-Alonso and Ericsson 2007).

S.No.	Constituent	Composition	Effect/role
1.	Lipids		
	(a) <i>Simple lipids</i>	Saturated fatty acids (SFAs) e.g., Lauric acid Monounsaturated fatty acids (MUFAs) e.g., Oleic acid	Raise blood cholesterol levels-harmful for health Reduce blood cholesterol levels-Raise HDL levels-good for health
	(b) <i>Compound lipids</i>	Poly unsaturated fatty acids (PUFAs) e.g., Linolenic acid Trans fatty acids (TFAs) e.g., Elaidic acid	Good for health Raise LDL cholesterol levels and lower HDL cholesterol levels harmful for health
	(c) <i>Neutral lipids</i>	Esters of fatty acids with alcohol along with phospholipids, sulfolipids, aminolipids, cerebroside Uncharged lipids, glycerides, cholesterol and cholesterol esters	Harmful for health
2.	Cholesterol	Steroidal substances, essential components of cell membranes, brain and nerve cells, as well as bile. Useful in biosynthesis of vit. D and various sterol hormones	Higher levels can cause hypercholesterolemia; which is a risk factor
3.	Triglycerides (TG)	Major constituents of chylomicron and VLDL	Are energy substrates for liver and peripheral tissues, especially, muscles. High levels of TG is a risk factor
4.	Lipoproteins		
	Chylomicrons	95% TG and 5% Cholesterol	Mobilize dietary lipids, deliver dietary triglycerides to adipose tissues, muscles and dietary cholesterol to liver
	VLDL	80% TG and 20% Cholesterol	Transport triglycerols to extra hepatic tissues
	IDL	50% TG and 50% Cholesterol	They are either converted to LDL or taken up by the liver
	LDL	10% TG and 90% Cholesterol	Principal plasma carriers of cholesterol for delivering to peripheral tissues
	HDL	5% TG 95% Cholesterol	The apo E in HDLs leads to an increase uptake of cholesterol and its catabolism by the liver to lower the levels of intracellular cholesterol
5.	Lipoprotein (a)	Is an apoprotein (apo) B-100 lipoprotein	High concentrations are associated with increased apo (a) secretion
6.	Apoproteins	These are proteins that carry lipids in plasma, hence making lipoproteins soluble	They stabilize the structure of protein and act as ligands for specific receptors having physiological role in the lipoprotein metabolism

Tableau I-6: Composition et rôle des différents lipides et lipoprotéines (Jain, Kathiravan et al. 2007).

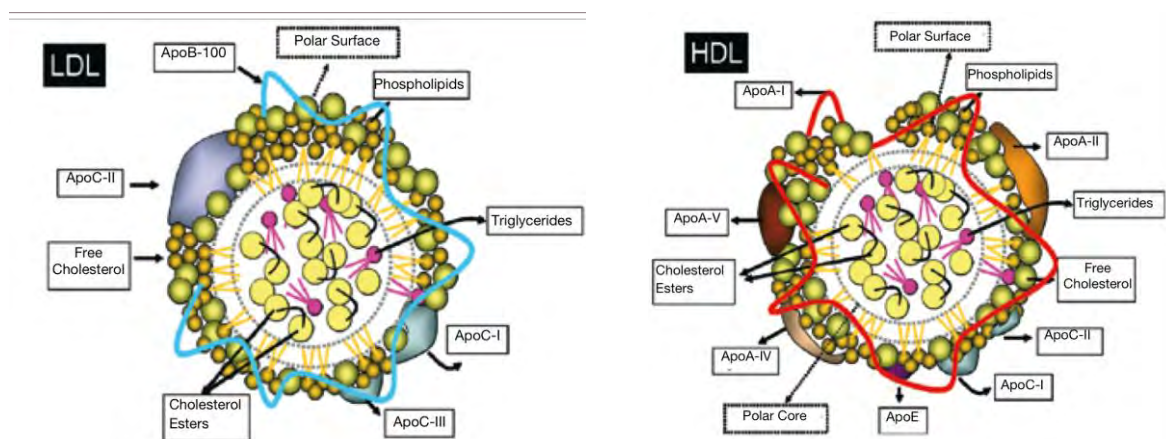


Figure I-4: Structure d'une lipoprotéine de faible et de haute densité (LDL et HDL). Comme la plupart des lipoprotéines, elles possèdent une partie centrale composée de lipides apolaires comme des triglycérides et du cholestérol, entourée d'une monocouche de phospholipides où s'insèrent des molécules de cholestérol estérifié et des protéines de structuration, les apolipoprotéines de différentes classes selon la classe de lipoprotéines (Badimon, Vilahur et al. 2009).

Apoprotein—[MW (Da)]	Lipoprotein association	Comments
apo A-I (29,016)	Chylomicrons, HDL	Major protein of HDL, activates Lecithin, Cholesterol AcylTransferase (LCAT)
apo A-II (17,400)	Chylomicrons, HDL	Primarily in HDL, enhances Hepatic Lipase activity
apo A-IV (46,000)	Chylomicrons and HDL	Present in triacylglycerol rich lipoproteins
apo B-48 (241,000)	Chylomicrons	Exclusively found in chylomicrons, derived from apo B-100 gene by RNA editing in intestinal epithelium; lacks the LDL receptor-binding domain of apo B-100
apo B-100 (513,000)	VLDL, IDL, and LDL	Major protein of LDL, binds to LDL receptor; one of the longest known proteins in humans
apo C-I (7600)	Chylomicrons, VLDL, IDL, and HDL	May also activate LCAT
apo C-II (8916)	Chylomicrons, VLDL, IDL, and HDL	Activates Lipoprotein Lipase
apo C-III (8750)	Chylomicrons, VLDL, IDL, and HDL	Inhibits Lipoprotein Lipase
apo D (33,000)	HDL	Closely associated with LCAT activation
Cholesterol Ester Transfer Protein(CETP)	HDL	Exclusively associated with HDL and cholesteryl ester transfers
apo E (34,000) (at least 3 alleles [E ₂ , E ₃ , E ₄] each of which has multiple isoforms)	Chylomicron remnants, VLDL, IDL and HDL	Binds to LDL receptor, apo E ₄ allele amplification associated with the late-onset of Alzheimer's disease
apo (a) (3,00,000–8.00,000) (At least 19 different alleles.)	LDL	Disulfide bonded to apo B-100, forms a complex with LDL identified as lipoprotein (a) or Lp (a); strongly resembles plasminogen; may deliver cholesterol to sites of vascular injury. High risk association with premature coronary artery disease and stroke

Tableau I-7: Propriétés des apolipoprotéines, avec leurs fonctions respectives et les lipoprotéines auxquelles elles sont associées (Jain, Kathiravan et al. 2007).

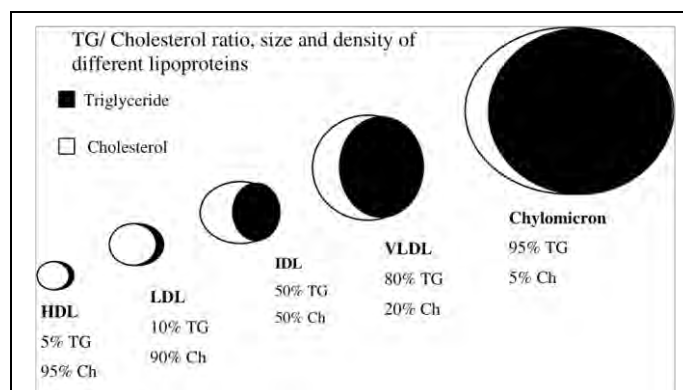


Figure I-5: Classification des lipoprotéines en fonction du ratio triglycérides (TG)/Cholestérol (Ch) de la taille et de la densité (Jain, Kathiravan et al. 2007).

cholestérol libre. La synthèse et le métabolisme général du cholestérol sont repris à la Figure I-2. Le métabolisme du cholestérol est régulé par des protéines régulatrices, nommées SREBP (Sterol regulatory element-binding protein). Ces protéines sont des facteurs de transcription liant les séquences consensus SRE (Sterol regulatory element) présentes dans les promoteurs de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol ainsi que dans la synthèse de stérols. Le mode d'action des SREBP est repris en Figure I-3.

2.1.1. Le concept de lipoprotéine

Les lipides, comme le cholestérol, insolubles dans l'eau, ne peuvent être transportés dans le plasma que grâce à leur association avec une ou plusieurs protéines spécifiques, les apolipoprotéines. Ces systèmes de complexes macromoléculaires peuvent alors être véhiculés dans la circulation sous forme soluble afin d'assurer le transport et la redistribution des lipides exogènes et endogènes et des substances liposolubles entre les différents tissus impliqués dans leur métabolisme. La composition et le rôle des lipoprotéines et des lipides associés sont détaillés dans le Tableau I-6.

2.1.2. Structure et classification des lipoprotéines

Les lipoprotéines possèdent généralement une structure sphérique composée d'une partie centrale plus ou moins volumineuse, entourée d'une couche périphérique. Le noyau central est composé de lipides apolaires, insolubles dans l'eau comme les triglycérides et le cholestérol estérifié. La couche périphérique est constituée par les lipides polaires assemblés en une monocouche de phospholipides dans laquelle s'insèrent des molécules de cholestérol non estérifié et des apolipoprotéines liées de façon non covalente aux lipides, structurant les lipoprotéines et servant de ligand (Figure I-4). La cohésion de ces complexes est assurée par des liaisons hydrophobes entre les chaînes aliphatiques des acides gras des lipides et les chaînes aliphatiques des acides aminés apolaires des protéines ainsi que par des liaisons ioniques entre les groupes polaires des régions hélicoïdales des apoprotéines et ceux des phospholipides adjacents.

Les lipoprotéines plasmatiques comprennent plusieurs familles de lipoprotéines différentes, qui ont une composition lipidique et en apoprotéines variable, tant qualitativement que quantitativement. Les différentes classes d'apolipoprotéines et leur fonction sont reprises dans le Tableau I-7. De plus, deux catégories d'apoprotéines existent : les apoprotéines structurales intégrées dans la couche périphérique et ne pouvant la quitter, et les apoprotéines libres, faiblement liées qui font l'objet d'échanges entre lipoprotéines. Ces différentes combinaisons en apoprotéines et lipides sont à la base des différences fonctionnelles entre les différentes lipoprotéines.

Les lipoprotéines sont généralement classées en fonction de leur densité, leur taille et leur composition en lipides et protéines : les chylomicrons, les Very Low-Density Lipoproteins (VLDL), les Low-Density Lipoproteins (LDL), les Intermediate Density Lipoproteins (IDL), et les High Density Lipoproteins (HDL) (Matsuura, Kobayashi et al. 2006; Daniels, Killinger et al. 2009). La classification et la composition des différentes lipoprotéines sont reprises à la Figure I-5.

Les **LDL**, sont les principaux et les plus abondants transporteurs de cholestérol dans le plasma grâce à leur durée de vie de 3 jours. Elles dérivent des VLDL libérées dans la circulation par les hépatocytes et permettent le transport des deux tiers du cholestérol circulant, principalement sous forme estérifiée. Les LDL possèdent une densité comprise entre 1,019 et 1,063 g/ml et un diamètre de 20-25 nm. Leur composition consiste en un cœur hydrophobe contenant des triglycérides (9 %) et des esters de cholestérol (29 %) entouré d'une couche hydrophile de phospholipides (28 %) et de cholestérol libre (11 %) dans

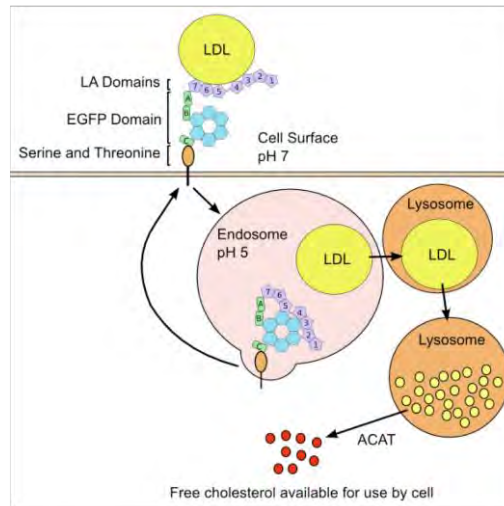


Figure I-6: Régulation de la charge en cholestérol. Lors d'un besoin de cholestérol, les cellules captent les LDL grâce à des récepteurs membranaires, les LDL-R, possédant trois domaines : le domaine LA (LDLR-type A domain), le domaine EPGF (epidermal growth factor precursor protein-like domain) et un domaine riche en résidus sérine et thréonine. Après fixation, les récepteurs se regroupent dans des structures appelées "coated pits" qui s'invaginent et formeront des vacuoles mobiles (endosomes) dans la cellule après l'endocytose. Les endosomes ainsi formés permettent le recyclage des récepteurs et fusionnent par la suite avec les lysosomes afin de s'y décharger. Les constituants des LDL sont alors catabolisés par les enzymes lysosomales. Les apoprotéines B-100 sont hydrolysées en aminoacides, les esters de cholestérol en acides gras et cholestérol libre (Daniels, Killinger et al. 2009).

laquelle s'insère l'apoprotéine B-100 (21 %), le ligand des récepteurs aux LDL (Matsuura, Kobayashi et al. 2006; Badimon, Vilahur et al. 2009).

Les **HDL** représentent une classe particulière et très hétérogène de lipoprotéines, de masse et de taille beaucoup plus faibles que les LDL (7-11 nm). Leur densité élevée est due à l'importante proportion de protéines (45-55 %). Les apoprotéines les plus abondantes sont les apoprotéines A-I et A-II, mais elles peuvent aussi porter les apoprotéines C et l'apoprotéine E, ainsi que des enzymes antioxydantes telles que la paraoxonase-1 (PON-1). Les HDL ont une activité anti-athérogène reconnue, car elle contribuent au transport inverse du cholestérol, mobilisant le cholestérol de l'intima des artères et des tissus périphériques et permettant son internalisation par les hépatocytes où il pourra être oxydé et éliminé via les sels biliaires (Ohashi, Mu et al. 2005). Les HDL jouent le rôle d'accepteurs et de transporteurs de cholestérol, mais elles protègent aussi les LDL contre l'oxydation. Elles exercent également des effets anti-inflammatoires comme l'inhibition de la migration et de l'adhérence de monocytes dans l'intima, l'inhibition de la prolifération des CML vasculaires, la prévention de la thrombose, ... (Singh, Mengi et al. 2002). Les HDL existent sous différentes formes en fonction de leur composition en apoprotéines (apoA-I ou apoA-II), leur densité (HDL2 ou HDL3) ainsi que de leur mobilité électrophorétique (α et pré- β) (Ohashi, Mu et al. 2005).

2.1.3. Métabolisme des lipoprotéines

Les lipides alimentaires, principalement constitués de triglycérides, sont absorbés par les entérocytes où ils s'associent à des apoprotéines pour constituer les **chylomicrons** natifs qui passent dans la lymphe puis dans le sang. Dans la circulation, les chylomicrons sont rapidement épurés de 90 % de leurs triglycérides par la lipoprotéine lipase (LPL) et libèrent des constituants de surface. Les particules résiduelles, appelées « chylomicrons remnants », sont rapidement capturées et internalisées par le foie grâce à un récepteur spécifique de l'apoprotéine E.

En dehors des périodes digestives, le foie réexporte les triglycérides sous forme de **VLDL**, porteuses de l'apo-B100 néosynthétisée. Le transport des lipides endogènes comporte deux circuits opposés : un circuit « hépatofuge » et un circuit « hépatopète » permettant respectivement la redistribution du cholestérol via le sang vers les tissus périphériques et les organes et son élimination via un transport inverse vers le foie, capable de le dégrader en acide cholique, précurseur des sels biliaires.

Durant le circuit "hépatofuge", le transport vers les tissus du cholestérol et des triglycérides synthétisés par le foie, est assuré par les VLDL et leurs produits de transformation, les IDL et les LDL. Contrairement aux HDL, les LDL ne sont pas d'origine hépatique. En effet, elles dérivent de VLDL résiduelles. Le foie sécrète des VLDL, lipoprotéines riches en triglycérides, qui vont subir divers changements tels que l'acquisition d'apolipoprotéines (ApoC, ApoE) et l'élimination progressive de triglycérides suite à l'action de la lipoprotéine lipase donnant naissance à des VLDL plus petits, appelés IDL. Ces lipoprotéines ont deux destinées, soit être captées et métabolisées au niveau du foie, soit être transformées en LDL, grâce à l'action de la lipase hépatique (LH), la capture d'esters de cholestérol ou l'échange de cholestérol à partir des HDL, principalement via la CETP (cholesteryl ester transfer protein) (Daniels, Killinger et al. 2009). Les **LDL** transportent ainsi les deux tiers du cholestérol circulant qu'elles délivrent aux cellules hépatiques et aux tissus périphériques en se fixant sur un récepteur membranaire spécifique appelé récepteur B ou E, ou encore le récepteur des LDL natives. Lorsque les cellules ont besoin de cholestérol, elles captent les LDL grâce à des récepteurs membranaires spécifiques des apoprotéines B et E. Cette fixation des LDL se fait de façon spécifique et saturable. Après fixation, les récepteurs se regroupent dans des structures appelées "coated pits" ou vésicules tapissées, qui formeront des vacuoles mobiles

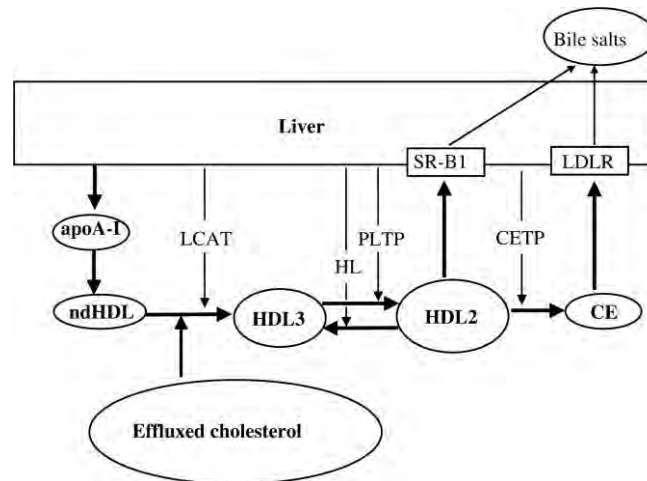


Figure I-7: Transport inverse du cholestérol. Cette voie permet de délivrer le cholestérol libre des macrophages ou autres cellules jusqu'au foie afin d'être éliminé. Les principaux acteurs de cette voie sont les lipoprotéines de haute densité (HDL), l'apolipoprotéine A-I (apoA-1), des enzymes telles que la lécithine :cholestérol acyltransférase (LCAT) et la « phospholipid transfer protein » (PLTP), l'« hepatic lipase » (HL) et la « cholesterol ester transfer protein»(CETP). Premièrement, l'apoA-1 produite par le foie est relarguée dans le plasma où elle interagit avec des phospholipides et les ndHDL, une forme de HDL naissantes et discoïdales. Une fois ces ndHDL générées, elles déclenchent l'efflux de cholestérol à partir des macrophages et des fibroblastes de l'espace subendothélial. Le cholestérol transloqué est ensuite absorbé par les ndHDL et estérifié par la LCAT. Les HDL sont ensuite enrichies en cholesteryl esters et gagnent du volume en se transformant en HDL3 et HDL2 faisant intervenir la PLTP, permettant la fusion de 2 HDL3 en 1 HDL2. Les HDL enrichies en triglycérides sous l'action de la HL, rétrécissent et se densifient. La CETP facilite l'échange de cholesteryl esters des HDL aux lipoprotéines contenant de l'ApoB100 et en particulier les IDL qui se transforment ainsi en LDL. Ces cholesteryl esters retournent ensuite vers le foie via le récepteur aux LDL (LDL-R), où ils peuvent être convertis en sels biliaires et finalement éliminés par le tractus gastro-intestinal (Ohashi, Mu et al. 2005).

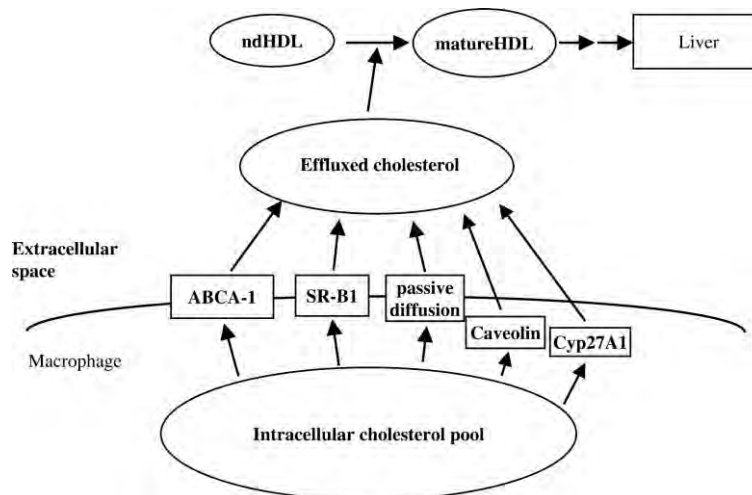


Figure I-8: L'efflux de cholestérol. Durant ce processus, 5 acteurs permettent la translocation du cholestérol dans l'espace extracellulaire et permettent le transfert de cholestérol intracellulaire des macrophages ou d'autres cellules aux récepteurs extracellulaires telles que l'apolipoprotéine A-I (apoA-1) des HDL. Le récepteur « scavenger » B1 (SR-B1) est capable d'induire l'efflux de cholestérol par liaison des HDL aux cellules et par reconnaissance des lipides au sein de domaines riches en cholestérol au sein de la membrane plasmique. Les cavéolines, associées aux cavéoles, peuvent aussi lier le cholestérol et permettre le transport du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique. L'ATPase ABCA-1 (ATP-binding cassette A-1) et la stérol 27-hydroxylase (CYP27A1) contribuent aussi à l'efflux du cholestérol. Une diffusion passive du cholestérol pourrait aussi participer à ce processus (Ohashi, Mu et al. 2005).

dans la cellule après l'endocytose. Les récepteurs libérés rejoignent la membrane cellulaire pour un nouveau cycle et les vacuoles, captées par les lysosomes, s'y déchargent. Les constituants des LDL sont alors catabolisés par les enzymes lysosomales (Figure I-6). Les apoprotéines Apo-B100, elles, sont hydrolysées en aminoacides, les esters de cholestérol en acides gras et cholestérol libre ce qui déclenche un triple effet régulateur : l'inhibition de la synthèse de HMG-Co-A réductase et donc de la synthèse de cholestérol, la stimulation de l'acyl cholestérol-acyl transférase (ACAT) qui estérifie le cholestérol libre intracellulaire et l'inhibition de la synthèse des récepteurs des LDL (R-LDL), dont le nombre diminue, ce qui protège la cellule d'une surcharge en cholestérol. Ces effets régulateurs dépendent entre autres du facteur de transcription SREBP (voir paragraphe 2.1) (Badimon, Vilahur et al. 2009; Daniels, Killinger et al. 2009).

Le circuit "hépatopète" encore appelé transport inverse du cholestérol (RTC), assuré par les **HDL**, ramène le cholestérol excédentaire des tissus vers le foie. Ainsi, en réduisant l'accumulation de cholestérol dans les parois artérielles, le RTC réduit et prévient le développement de cardiopathies comme l'athérosclérose. Les principaux acteurs du RTC sont les HDL, l'apolipoprotéine A-I (apoA-1), des enzymes telles que la lécithine :cholestérol acyltransférase (LCAT) et la « phospholipid transfer protein » (PLTP), l'« hepatic lipase » (HL) et la « cholesterol ester transfer protein » (CETP) permettant au cholestérol et aux esters de cholestérol (CE) d'être transférés au foie par l'intermédiaire du récepteur « scavenger » SR-B1, le récepteur des HDL et le récepteur aux LDL (LDL-R) afin d'être convertis en sels biliaires et éliminés par l'intestin (Hill and McQueen 1997; Ohashi, Mu et al. 2005). Ce transport inverse du cholestérol est détaillé dans la Figure I-7. Durant ce transport inverse, il existe un processus majeur, l'efflux de cholestérol (Figure I-8) durant lequel les macrophages de la paroi vasculaire secrètent le cholestérol en dehors des cellules. Ce processus se réalise par le biais de 5 acteurs : l'ATP-binding membrane cassette transporter A1 (ABCA1), le récepteur « scavenger » B1 (SR-B1), les cavéolines, Cyp27A1 et la diffusion passive (Ohashi, Mu et al. 2005).

De cette manière, l'efflux de cholestérol et le RTC constituent une voie efficace par laquelle l'excès de cholestérol peut être éliminé du corps. De ce fait, l'augmentation des taux plasmatiques d'HDL pourrait favoriser l'efflux de cholestérol et son transport inverse, contribuant ainsi à une diminution du risque de cardiopathies. Les statines, connues pour diminuer le taux de cholestérol circulant, et plus précisément de LDL et des triglycérides, en inhibant la HMG CoA réductase, permettent également d'augmenter le taux de HDL via l'augmentation de la synthèse et la sécrétion d'apoA-I (Ohashi, Mu et al. 2005). En effet, des études ont montré que l'atorvastatine augmentait les taux d'apoA-1 et permettait également de réduire les lipoprotéines contenant apoB, dont les LDL, IDL et VLDL (pour revue voir : (Bonn, Cheung et al. 2002; Guerin, Egger et al. 2002).

2.2. Contexte inflammatoire

L'inflammation joue un rôle important dans tous les stades de l'athérosclérose. En effet, la composante inflammatoire représente une des caractéristiques les plus importantes de la pathologie. Ainsi, les plaques stables sont caractérisées par une inflammation chronique tandis que les plaques plus vulnérables sont associées à une inflammation active impliquant une fine épaisseur de la chape fibreuse favorisant la rupture de la plaque.

L'adhérence des monocytes à l'endothélium et leur migration à travers la paroi vasculaire est facilitée par la présence de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales. L'enroulement des monocytes sur la couche de cellules endothéliales est médié par des protéines d'adhérence de la famille des sélectines. En effet, le dysfonctionnement de l'endothélium ainsi que la présence de LDL, et des LDL oxydées plus précisément, induisent

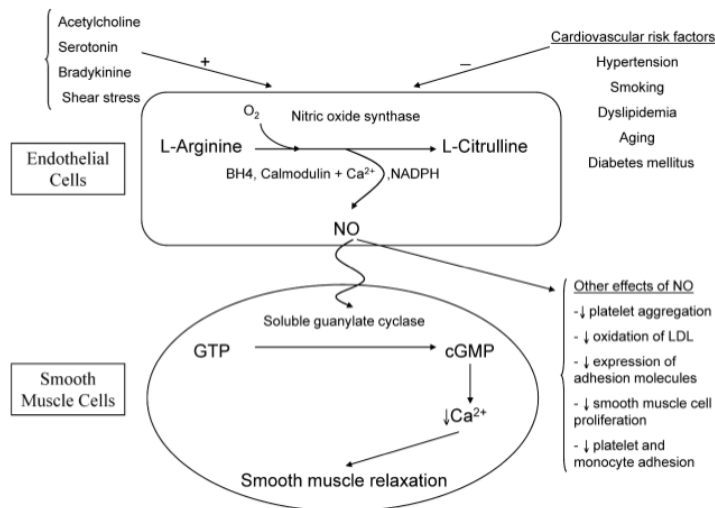


Figure I-9: Régulation de la production et fonctions de l'oxyde nitrique. L'oxyde nitrique est synthétisé suite à la conversion de L-arginine en L-citrulline via la eNOS, dans les cellules endothéliales. Cette réaction peut être influencée positivement pas divers facteurs comme le « shear stress », la sérotonine, l'acétylcholine, mais peut aussi être inhibée par des facteurs de risque cardiovasculaires comme le tabagisme, l'hypertension, le diabète, ... Une fois synthétisé, le NO peut remplir diverses fonctions comme l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, de l'oxydation des LDL, de l'expression de molécules d'adhérence, ... mais peut aussi favoriser la vasodilatation via l'activation de la guanylate cyclase soluble au niveau des cellules musculaires lisses (Khazaei, Moien-Afshari et al. 2008).

l'expression de E-sélectines à la surface de l'endothélium activé dont les ligands majeurs sont les motifs sucrés hautement fucosylés et sialylés portés par des protéines membranaires leucocytaires. Cependant, l'interaction entre les sélectines et leurs ligands n'est pas suffisante pour permettre une adhérence forte entre les monocytes et les cellules endothéliales; cette étape requiert l'expression et l'activation d'intégrines leucocytaires, ainsi que leur interaction avec leurs ligands comme les « intercellular adhesion molecule-1 » (ICAM-1) et les « vascular adhesion molecule-1 » (VCAM-1) à la surface de l'endothélium. En temps normal, les intégrines exprimées par les monocytes dans la circulation sanguine, ont peu d'affinité pour leur ligand, mais dans un contexte inflammatoire et en présence de chémokines, leur affinité augmente, ce qui permet alors l'adhérence ferme des monocytes à l'endothélium. Ainsi, intégrines et sélectines sont fortement exprimées par l'endothélium activé et contribuent à l'extravasation des monocytes et donc au développement de l'athérosclérose. De plus, divers chémoattractants et cytokines régulent l'adhérence et la migration de cellules sanguines à travers la paroi artérielle. Au sein des lésions athéromateuses, les cellules endothéliales et les monocytes produisent de nombreux facteurs chimiotactiques comme le « monocyte chemoattractant protein-1 » (MCP-1), le « macrophage colony-stimulating factor » (M-CSF), le « granulocyte/macrophage colony stimulating factor » (GM-CSF), le « tumour necrosis factor α » (TNF- α), le « transforming growth factor β » (TGF- β) et l'endothéline-1 (ET-1) et sont activés par de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines (IL-1, IL-6, IL-12) et le TNF- α produit par les cellules endothéliales en réponse à l'infiltration de lipoprotéines.

Ainsi, en réponse au stimuli chimiotactiques libérés dans l'intima, les monocytes circulants se fixent sur l'endothélium activé, par les LDL oxydées par exemple, et migrent à travers la paroi vasculaire par diapédèse. Outre les intégrines, deux protéines présentent aux jonctions cellulaires des cellules endothéliales, la « platelet endothelial adhesion molecule-1 » (PECAM-1) et la « junctional adhesion molecule-1 » (JAM-1), participent à la diapédèse transendothéliale. De plus, les cellules endothéliales produisent également le MCP-1, le M-CSF et l'IL-6 qui permettent l'amplification de la cascade inflammatoire (Singh, Mengi et al. 2002; Bobryshev 2006).

2.3. Dysfonctionnement endothélial

L'endothélium constitue un organe actif endocrine, paracrine et autocrine multifonctionnel formant une barrière entre le sang et les tissus. Il exerce diverses fonctions comme la régulation de la tonicité vasculaire, la formation d'oxyde nitrique (NO) et de prostaglandines, le maintien des composants de la matrice extracellulaire, la régulation de la prolifération des CML, de la coagulation et de la fibrinolyse; il présente également une perméabilité variable aux protéines du plasma et aux lipoprotéines et module l'adhérence des cellules sanguines ainsi que leur transmigration durant la diapédèse (Singh, Mengi et al. 2002; Davignon and Ganz 2004).

L'endothélium vasculaire possède donc la capacité de produire et relarguer des substances vasoactives. Parmi les vasodilatateurs, on retrouve la prostacycline (PGI₂), l'EDHF et le NO, une molécule gazeuse, radicalaire et lipophile, aux propriétés cytoprotectrices ou cytotoxiques selon sa concentration. Le NO, identifié à l'origine comme le EDRF (endothelium-derived relaxing factor) induit divers mécanismes tels que la vasodilatation induite par stimulation de la guanylate cyclase et par augmentation de la production de guanosine monophosphate cyclique (cGMP) dans les CML, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la prolifération des CML et l'inhibition de la capture des LDL (Singh, Mengi et al. 2002; Forstermann and Munzel 2006; Khazaei, Moien-Afshari et al. 2008; Higashi, Noma et al. 2009). La régulation de la production et les fonctions du NO sont schématisées à la figure I-9. De plus, cette molécule joue un rôle anti-inflammatoire important. En effet, le NO bloque l'expression de molécules d'adhérence comme ICAM-1 et VCAM-1, diminuant

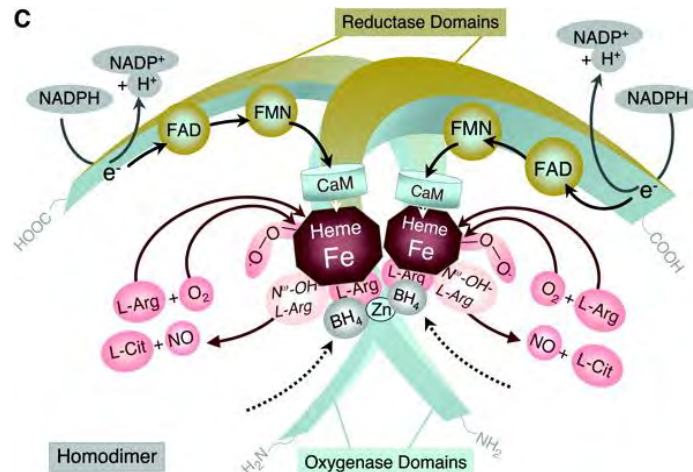


Figure I- 10: Structure et activité de la eNOS. L'oxyde nitrique synthase endothéliale est formée de deux monomères chacun composé d'un domaine réductase et d'un domaine oxygénase. Les monomères ou même les domaines réductase isolés, peuvent catalyser le transfert d'électrons du NADPH vers l'oxygène, produisant des ions superoxyde. Le dimère est stabilisé par les noyaux hémiques et lorsque le cofacteur BH_4 et le substrat, la L-arginine, sont en quantités suffisantes, il y a couplage entre l'activité réductase et oxygénase, responsable de la synthèse de NO à partir de L-arginine. Un produit secondaire est également synthétisé, la L-citrulline (Forstermann and Munzel 2006).

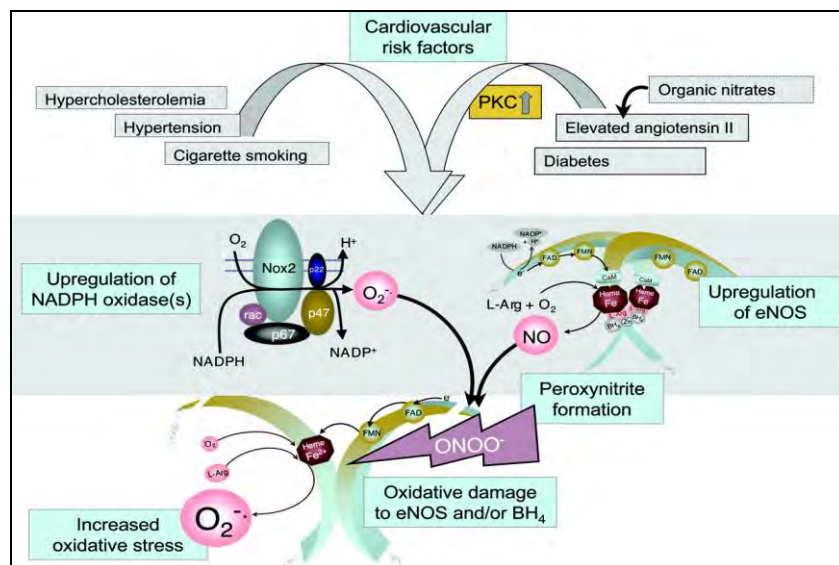


Figure I-11: Dysfonctionnement endothélial. En présence de facteurs de risque comme l'hypertension, le tabagisme, ..., les NADPH oxydases et les NOS vasculaires sont suractivées (eNOS) ou induites (iNOS). Leurs produits respectifs, l'anion superoxyde et le NO, peuvent se combiner pour former du peroxynitrite qui va augmenter les dommages oxydatifs et permettre le découplage de la eNOS qui produira en excès des anions superoxyde à la place du NO, qui renforceront encore le stress oxydatif (Forstermann and Munzel 2006).

l'adhérence et l'infiltration des leucocytes et contribue, par conséquent, à la stabilisation de la plaque par diminution du contexte pro-inflammatoire (Bonetti, Lerman et al. 2003; Badimon, Vilahur et al. 2009). Grâce à ses différentes fonctions, le NO représente l'un des mécanismes physiologiques les plus importants de défense anti-athéromateuse.

Les NO synthases (NOS) existent sous 3 isoformes : la NOS-I ou NOS neuronale (nNOS) présente essentiellement au niveau du système nerveux, la NOS-II ou NOS inducible (iNOS), présente dans les monocytes, les macrophages et autres cellules inflammatoires, mais aussi les CMLs, et enfin la NOS-III ou NOS endothéliale (eNOS) responsable de la production de la majeure partie du NO vasculaire (Singh, Mengi et al. 2002; Khazaei, Moien-Afshari et al. 2008).

La eNOS comme les autres NO synthases, catalyse la conversion de son substrat, la L-arginine, en L-citrulline. Chaque NOS possède un domaine réductase à l'extrémité C-terminale liant le NAD(P)H, le FMN et le FAD et un domaine oxygénase N-terminal portant un groupe hème prosthétique liant le BH₄, la molécule d'oxygène et la L-arginine. D'abord synthétisées sous forme monomérique, les NOS s'homodimérisent. Cette homodimérisation permettant l'interaction entre les domaines réductase et oxygénase est requise pour la synthèse de NO. L'enzyme est également régulée par la concentration intracellulaire en calcium et son activation est calmoduline-dépendante. La structure de la eNOS et la synthèse de NO sont détaillées dans la figure I-10. La production de NO et de citrulline par la eNOS dépend aussi de la concentration intracellulaire du cofacteur BH₄ et de la concentration en arginine. La synthèse de NO requiert 2 cycles. Dans un premier temps, la NOS hydroxyle la L-arginine en N^ω-hydroxy-L-arginine. Dans un second temps, la NOS oxyde la N^ω-hydroxy-L-arginine en L-citrulline et oxyde nitrique (Forstermann and Munzel 2006; Bonaventura, Lunardi et al. 2009).

La eNOS peut aussi se retrouver sous forme monomérique. Dans ce cas, la capacité de transfert d'électrons du NADPH aux flavines et la synthèse de NO se retrouvent perturbées car aucune liaison du cofacteur BH₄ ou du substrat n'est possible, favorisant la réduction de l'O₂ en ions superoxyde. En absence de substrat, l'arginine, la NOS fonctionne comme un système produisant des ions superoxyde. De plus, des recherches récentes ont montré que la production de superoxyde à partir de NOS provenait de l'impossibilité de l'enzyme à se dimériser suggérant que des monomères de NOS ou même des domaines réductase isolés étaient suffisants pour permettre la production de superoxyde (Michiels 2003; Forstermann and Munzel 2006; Khazaei, Moien-Afshari et al. 2008; Bonaventura, Lunardi et al. 2009).

Enfin, une production importante et concomitante de NO et d'ions superoxyde, va permettre la production de peroxynitrite, molécule très réactionnelle pour les lipides, les acides nucléiques, les protéines et les lipoprotéines. En outre, cette production diminue la biodisponibilité du NO et contribue au découplage de la NOS, par oxydation de la BH₄ et de cystéines présentes dans le site actif, amplifiant d'avantage les effets néfastes de la eNOS découplée. La NO découplée ne peut produire que des ions superoxyde (Fearon and Faux 2009).

Des facteurs de risque comme l'hypertension, l'hypercholestérolémie, le tabagisme... sont reconnus pour activer/induire des enzymes comme les NAD(P)H oxydases produisant les ions superoxyde et la iNOS produisant du NO en grandes quantités dans la paroi vasculaire, favorisant ainsi la production de peroxynitrite et le découplage de la eNOS, diminuant la biodisponibilité en NO à la base même du dysfonctionnement endothélial (Figure I-11) (Forstermann and Munzel 2006; Bonaventura, Lunardi et al. 2009).

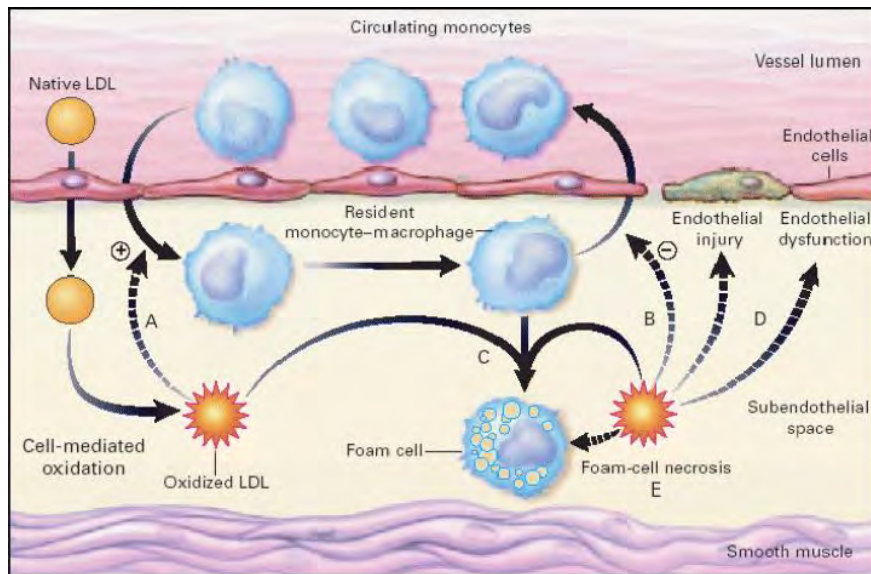


Figure I-12: Modèle classique de l'oxydation des LDL. L'oxydation des LDL se déroulerait dans l'intima favorisant leur capture par les macrophages et la formation de cellules spumeuses. Suite à ces modifications, les LDL oxydées contribuent à l'athérogénèse (A) en renforçant le recrutement de monocytes circulants dans l'espace intimal, (B) en réduisant la capacité des macrophages résidents à quitter l'intima, (C) en augmentant la capture des lipoprotéines modifiées et la formation de cellules spumeuses et (D) en exerçant des effets cytotoxique, conduisant à la perte de l'intégrité de l'endothélium et au dysfonctionnement endothélial (Stocker and Keaney 2004).

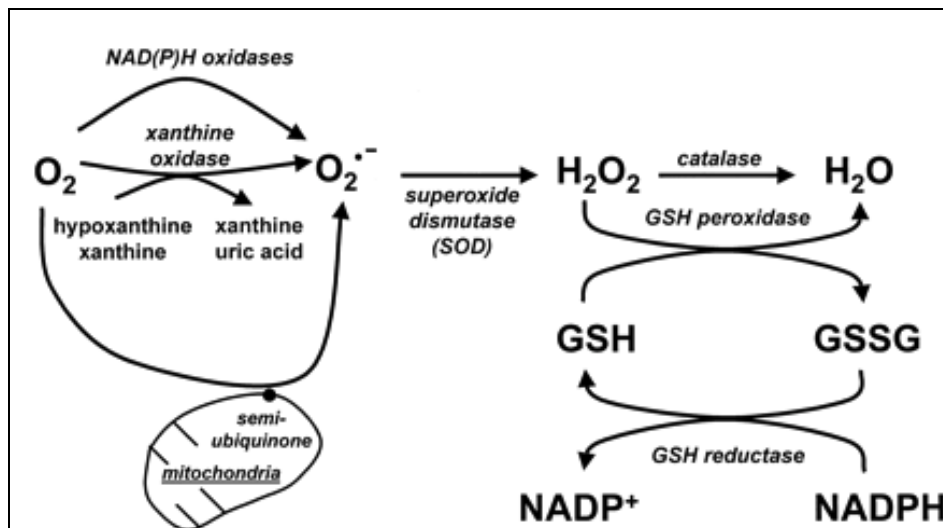


Figure I-13: Voies de production et d'élimination de ROS. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) peuvent être générées par divers mécanismes dont les NAD(P)H oxydases, la chaîne de transport d'électrons au sein de la mitochondrie, la xanthine oxydase, ... Cependant, des mécanismes permettent également d'éliminer l'excédant de ROS. Les superoxyde dismutase (SOD) permettent de convertir l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), lui aussi toxique. Afin de contrecarrer cet effet néfaste, deux enzymes, la catalase et les GSH peroxydases, permettent la transformation de l' H_2O_2 en eau (H_2O) via l'oxydation du glutathion (GSH) en disulfure de glutathion (GSSG), pouvant être reconverti en glutathion réduit via la glutathion réductase utilisant le NADPH (Droge 2002).

3. Stress oxydatifs et modifications oxydatives des LDL

Il est connu que l'athérosclérose est étroitement liée au métabolisme des lipoprotéines. La vue classique propose que les LDL entrent dans l'intima ainsi que les monocytes. Ces derniers se différencient en macrophages, tandis que les LDL s'oxydent, ce qui entraîne leur internalisation par les macrophages qui deviennent progressivement des cellules spumeuses. Le modèle classique d'oxydation des LDL est présenté à la figure Figure I-12. Avant de voir les mécanismes hypothétiques à la base de l'oxydation des LDL, nous allons faire quelques rappels sur les dérivés actifs de l'oxygène ou ROS.

Les ROS sont produits dans toutes les cellules et les tissus à des concentrations relativement basses. Ces concentrations sont fonction d'une balance entre le taux de production de ces dérivés actifs et leur taux d'élimination via divers composés et enzymes antioxydantes. En conditions pathologiques, la balance entre les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) et les antioxydants peut pencher en faveur de l'augmentation de ROS, résultant en un stress oxydatif. Cependant, les tissus dont le myocarde, sont équipés d'une variété de systèmes antioxydants enzymatiques endogènes et non-enzymatiques permettant de métaboliser les ROS. Les superoxide dismutases (SOD) permettent d'inactiver les anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et de former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui, à son tour, est pris en charge par une série d'enzymes, la catalase et les glutathion peroxidases (GPx) afin de contrer les effets néfastes de ce produit (Figure I-13). De plus, des composés non enzymatiques comme l' α -tocophérol (ou vitamine E), le β -carotène, l'ascorbate (ou vitamine C) et le glutathion peuvent aussi contrer les effets des ROS (Droge 2002; Townsend, Tew et al. 2003; Higashi, Noma et al. 2009; Borchi, Bargelli et al. 2010).

3.1. Sources majeures de ROS

Les radicaux libres représentent toute molécule possédant un ou deux électrons libres non appariés. Il existe une multitude de systèmes enzymatiques intracellulaires générant des radicaux libres contribuant au stress oxydatif et à la génération de ROS, un terme plus général regroupant les radicaux libres oxygénés et d'autres molécules non-radicalaires contenant de l'oxygène tel que le H_2O_2 . L'oxygène est une molécule abondante dans les systèmes biologiques. En plus d'être un (di)radical, l'oxygène est réactif car ses deux électrons non appariés sont situés sur des orbitales différentes et de spins parallèles. De ce fait, l'oxygène peut subir des réductions univalentes, produisant les ions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (Madamanchi 2005).

Les sources majeures de ROS dans la cellule comprennent la mitochondrie et divers systèmes enzymatiques. Cependant, les mécanismes de stress oxydatif et l'activité des enzymes antioxydantes sont loin d'être totalement compris. Une des premières sources d'espèces radicalaires est la **chaîne de transporteurs d'électrons** mitochondriale. Ce complexe de transporteurs d'électrons génère un gradient de protons à travers la membrane interne mitochondriale, servant de force motrice à la formation d'adénosine 5'-phosphate (ATP) par l'ATP synthase. Cependant, une légère perte d'électrons (de 0,2 à 2 %) se produit lors du transport au niveau des complexes I (NADH-ubiquinone réductase) et III (succinate-ubiquinone oxido-réductase) ce qui induit une réduction univalente des molécules d'oxygène en anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). De plus, certaines conditions pathologiques, la présence d'agents pro-athérogènes comme des taux élevés en glucose ou le tabagisme semblent accentuer cette fuite d'électrons au niveau de la respiration mitochondriale et augmenter la production de radicaux libres (Madamanchi, Vendrov et al. 2005; Fearon and Faux 2009).

D'autres études ont démontré que la source majeure de ROS dans les maladies cardiovasculaires provient d'un complexe enzymatique associé à la membrane, la

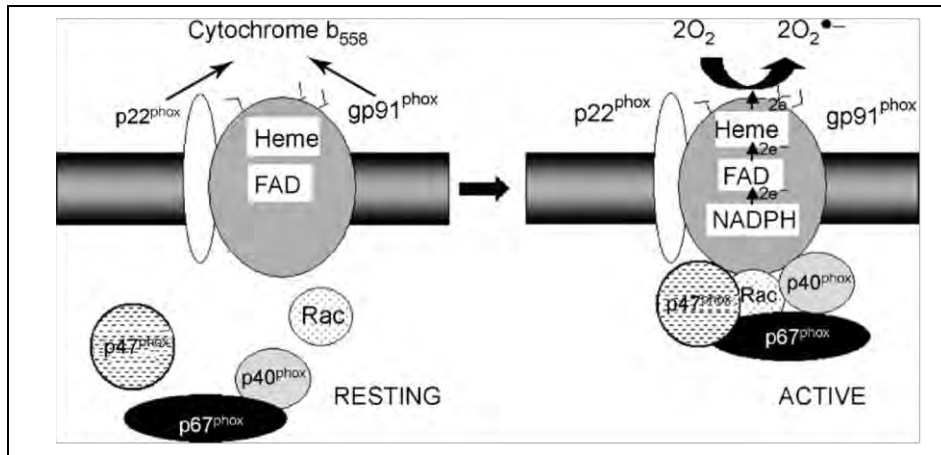


Figure I-14: Activité NADPH oxydase. Au repos, l'enzyme est simplement formée de gp91^{phox} et de p22^{phox} liées à la membrane cellulaire ainsi que du flavocytochrome b₅₅₈. Cependant, lorsqu'elle est activée par divers stimuli, le complexe recrute d'autres sous-unités, deux sous-unités cytosoliques, p47^{phox} et p67^{phox}, ainsi qu'une petite protéine G, Rac. Le complexe, une fois formé, permet la production d'anions superoxyde à partir de l'oxygène en utilisant le NADH ou le NADPH comme donneur d'électrons (Gonzalez, Agapito et al. 2007).

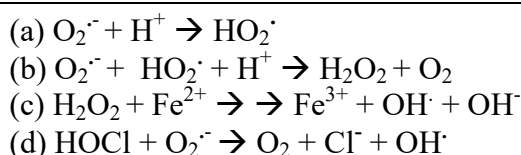
I. Introduction

nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (Borchi, Bargelli et al. 2010). Ce complexe est formé de 5 composants : deux sous-unités cytosoliques, p47^{phox} et p67^{phox} ; gp91^{phox} (NOX2) et p22^{phox} formant un complexe membranaire liant le flavocytochrome b558, et une petite protéine G, Rac. Il utilise le NADH ou le NADPH comme donneur d'électrons générant de l' $O_2^{\cdot-}$ via la réduction de l'oxygène (Réaction 1).



Réaction 1

Ce complexe enzymatique est inactif en conditions normales, mais divers stimuli tels que l'angiotensine II, la thrombine, le TNF α ou l'IL-1, mais également les forces mécaniques comme le « shear stress » semblent le stimuler dans les cellules de la paroi vasculaire dont les cellules endothéliales (Stocker and Keaney 2004; Fearon and Faux 2009). Ces stimuli induisent la phosphorylation de p47^{phox}, jouant un rôle important dans l'assemblage des différentes sous-unités et l'activation du complexe afin de produire et relarguer l'anion superoxyde (Figure I-14). Il existe cependant une multitude de mécanismes permettant de transformer le superoxyde en radical plus agressif ; le superoxyde peut être protoné en radical HO_2^{\cdot} (Réaction 2a), dismuté en H_2O_2 (Réaction 2b) puis transformé en OH^{\cdot} via la réaction de Fenton (Réaction 2c), ou réagir avec l'acide hypochloreux, produit par la myéloperoxydase des phagocytes, afin de générer du OH^{\cdot} (Réaction 2d) (Gonzalez, Agapito et al. 2007).



Réaction 2

Bien que la NADPH oxydase et la respiration mitochondriale représentent les principales causes de stress oxydatif dans les pathologies cardiovasculaires, d'autres enzymes cellulaires peuvent aussi produire des radicaux libres contribuant également à ces maladies.

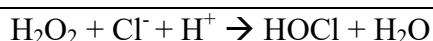
En conditions normales, les NOS transfèrent des électrons du NADPH via le groupe hème au substrat L-arginine afin de former de la L-citrulline et de l'oxyde nitrique, le BH_4 servant de cofacteur. Cependant, en conditions pathologiques et en particulier en présence de peroxynitrite, l'eNOS se découple (figure 1-12), produisant des ions superoxyde via le transfert d'électrons de l'hème sur l'oxygène (Stocker and Keaney 2004; Madamanchi, Vendrov et al. 2005).

La **xanthine oxydoréductase (XOR)**, une flavoprotéine multifonctionnelle retrouvée dans le plasma et les cellules endothéliales, est également reconnue comme système enzymatique producteur de ROS. Cette enzyme est composée de deux formes: la xanthine oxydase et la xanthine déshydrogénase. L'enzyme est synthétisée sous la forme de déshydrogénase, pouvant être convertie en oxydase, seule à générer de l' $O_2^{\cdot-}$, par oxydation réversible des groupements sulfhydryle. La XOR catalyse la formation de peroxyde d'hydrogène et d'acide urique à partir de xanthine, d'oxygène et d'eau, ou la formation de xanthine et de peroxyde d'hydrogène à partir d'hypoxanthine, d'oxygène et d'eau. Lors de l'oxydation de la xanthine en acide urique ou de l'hypoxanthine en xanthine, la déshydrogénase intervenant dans le processus redox produit du NADH, tandis que l'oxygénase génère des anions superoxyde (McNally, Davis et al. 2003; Stocker and Keaney 2004; Madamanchi, Vendrov et al. 2005; Fearon and Faux 2009).

Les **lipoxygénases** (LOX) et les **cyclooxygénases** (COX), connues pour leur rôle dans la synthèse respective de leukotriènes et de prostaglandines/ thromboxanes, peuvent aussi être une source de ROS en catalysant l'insertion stéréospécifique d'une molécule d'oxygène dans des acides gras polyinsaturés. Cette production de lipides biologiquement actifs, contribue aux réactions inflammatoires et peut favoriser la perméabilité vasculaire. Les lipoxygénases sont classées en 4 familles : 5-, 8-, 12- et 15-LOX, en fonction du site d'insertion de l'oxygène sur l'acide arachidonique. Certains métabolites formés par les différentes LOX, dont les métabolites de 5- et de 12-LOX, et les métabolites de COX, dont la PGF2 α , permettent d'activer la NADPH oxydase afin de former des ROS (Wittwer and Hersberger 2007; Kim, Kim et al. 2008; Fearon and Faux 2009).

Les phagocytes, présents aux sites d'inflammation, peuvent aussi être une source d'oxydants générant un stress oxydatif. Ces phagocytes sécrètent une protéine hémique présente en fortes concentrations principalement dans les monocytes/macrophages et les neutrophiles circulants, la **myéloperoxydase** (MPO). La MPO est une protéine glycosylée tétramérique de 140-155 kDa composée de deux dimères formés de chaînes lourdes et légères liées par un lien disulfure. Chaque chaîne lourde contient un hème ferrique auquel se lient différents halogénures (Cl $^-$, Br $^-$, I $^-$) et d'autres petits anions (NO $_2^-$, N $_3^-$, ...) tandis que d'autres substrats organiques de plus grande taille se fixent à une poche hydrophobe située à la surface de la MPO (Malle, Marsche et al. 2006). La synthèse de la MPO se déroule durant la différenciation myéloïde dans la moëlle osseuse et se termine au moment de l'entrée des granulocytes dans la circulation. Cette enzyme est stockée dans les granules primaires des neutrophiles et les monocytes et n'est relâchée que lors d'une activation des leucocytes et de leur dégranulation (Zhang, Brennan et al. 2001; Nicholls and Hazen 2005).

En effet, cette hème oxydase, catalyse, à l'aide de l'H $_2$ O $_2$, la conversion d'ion chlorure (Cl $^-$) en acide hypochloreux (HOCl) pouvant se dissocier en une forme extrêmement oxydante, l'anion hypochlorite (Réaction 3) pouvant oxyder les lipoprotéines (Takeshita, Byun et al. 2006). Le peroxyde d'hydrogène utilisé par la MPO dérive généralement d'ions superoxyde provenant de plusieurs sources dont les NAD(P)H oxydases, la xanthine oxydase ainsi que les NO synthases.



Réaction 3

De plus, la myéloperoxydase est capable de générer des radicaux secondaires et des oxydants non radicalaires pouvant participer aux réactions d'oxydation, conduisant à la peroxydation et l'oxydation des lipides, favorisant la capture des LDL par des récepteurs « scavenger » et la formation de cellules spumeuses. En effet, la MPO permet aussi la conversion de la L-tyrosine en radical tyrosyl induisant également des dommages aux LDL via leur oxydation (Berliner and Heinecke 1996). Ces nombreuses espèces réactives générées par la MPO dont l'acide hypochloreux, les chloramides, des radicaux tyrosyl, ... sont à leur tour capables d'initier la peroxydation lipidique mais aussi de promouvoir des modifications post-traductionnelles de protéines cibles comme l'halogénéation, la nitration, ... (Nicholls and Hazen 2005). L'acide hypochloreux généré par la MPO peut aussi oxyder les HDL, les transformant en HDL dysfonctionnelles et pro-inflammatoires modulant l'efflux de cholestérol et favorisant l'athérogénèse. En effet, la MPO, détectée dans les HDL isolées d'athéromes oxyderait l'apoA-I diminuant l'efflux de cholestérol par la voie ABCA1 et l'activation de la LCAT (Wei, Liu et al. 2009; Shao, Oda et al. 2010) (Pour revue voir : (Bergt, Pennathur et al. 2004)).

3.2. Modèles d'oxydation *in vitro* et *in vivo*

Parmi les LDL circulant dans le plasma, une portion quitte la circulation générale et pénètre dans l'espace subendothélial. Le modèle classique propose que l'oxydation des LDL ne prenne pas place dans la circulation étant l'abondance des antioxydants plasmatiques (Matsuura, Kobayashi et al. 2006). En effet, des concentrations importantes d'antioxydants et de protéines chélatant des ions métalliques sont présentes dans le plasma, ne favorisant pas l'oxydation des LDL (Berliner and Heinecke 1996). Cette réaction se déroulerait plutôt dans un environnement pauvre en antioxydants et où les LDL sont exposées à un stress oxydatif. Signalons cependant que certains auteurs proposent que les LDL puissent se lier à la surface de l'endothélium, au niveau du glycocalyx et éventuellement s'y oxyder (Berliner and Heinecke 1996).

Des recherches portant sur les mécanismes par lesquels les lipoprotéines de faible densité subissent des modifications oxydatives les rendant plus athérogènes, sont en cours depuis plus de trois décennies. De nombreux travaux se sont focalisés sur les modifications oxydatives *in vitro* sur des LDL purifiées.

Il existe une variété d'agents initiant le processus d'oxydation des LDL *in vitro* : dihydrochlorure de 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH), le 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (AMVM), les ions cuivriques, la céruloplasmine, le complexe metmyoglobine/H₂O₂, le complexe myéloperoxydase/H₂O₂, ... (Burkitt 2001). Cependant, la méthode la plus commune utilisée *in vitro* implique l'incubation des LDL en présence d'ions cuivriques (Cu²⁺). Dans la plupart des études menées sur l'effet des LDL oxydées dans le contexte de l'athérosclérose, le sulfate de cuivre (CuSO₄) est utilisé afin de modifier chimiquement les LDL. Cependant, bien que cette méthode d'oxydation est utilisée depuis longtemps, sa relevance physiologique est de plus en plus remise en question (Berliner and Heinecke 1996) notamment à cause des concentrations en sulfate de cuivre utilisées pour l'oxydation des LDL *in vitro* (Zarev, Bonnefont-Rousselot et al. 2003), concentrations beaucoup plus élevées que celles mesurées *in vivo* dans les plaques d'athérosclérose. En effet, les concentrations de sulfate de cuivre utilisées *in vitro* pour oxyder les LDL oscillent entre 10 et 20 µM tandis que les concentrations physiologiques seraient plutôt de l'ordre de 0,3 µM, conduisant à des propriétés très différentes au niveau structural et biochimique des LDL oxydées (Ziouzenkova, Sevanian et al. 1998).

À l'exception des azo-initiateurs, les autres agents semblent être des agents d'oxydation des LDL plus plausibles *in vivo*. Toutefois, la céruloplasmine, la 15-lipoxygénase, la MPO et la eNOS ont été retrouvées dans des lésions animales et humaines et pourraient donc contribuer à la modification des LDL *in vivo* (Carr, McCall et al. 2000). La céruloplasmine contribuerait significativement à l'oxydation des LDL *in vivo* durant les stades précoces de l'athérosclérose. D'autres données suggèrent l'importance de la 15-lipoxygénase dans l'oxydation des LDL, mais son rôle dans l'athérosclérose reste controversée, car le mécanisme par lequel l'enzyme intracellulaire attaquerait les LDL extracellulaire via des hydroperoxydes n'est pas clarifié. De plus, on ne détecte que peu de lipides présentant des modifications liées à l'action de la lipoxygénase (Carr, McCall et al. 2000). De nombreuses investigations suggèrent que la MPO, stockée dans les granules azurophiles des neutrophiles et des monocytes, serait responsable de l'oxydation des LDL. De plus, cette enzyme est présente dans les athéromes (Zouaoui Boudjeltia, Moguilevsky et al. 2004) et serait capable de se lier aux LDL (Daugherty, Dunn et al. 1994; Shah 2009) et plus précisément à l'Apo-B100 des LDL, ce qui permettrait la chlorination de ses résidus tyrosines sans oxyder la partie lipidique. Cependant, sous certaines conditions (par exemple à pH plus acide), la MPO peut attaquer la partie protéique et lipidique à la fois.

Class	Name	Ligands	Distribution	Specific characteristics
A	SR-A	AcLDL, OxLDL	Mph	Two isoforms (SR-AI, SR-AII) Trimeric coiled-coil structure
B	MARCO SR-BI (mouse) CLA-1 (human SR-BI) CD36	OxLDL, HDL OxLDL, FFA, OxPC PS, apoptotic cells AcLDL	Steroidogenic cells, liver Mph, platelets Heart tissue	Cholesterol delivery <i>via</i> selective transport system
C	SR-BII SR-C (drosophila) Cloquemort (insects)			
D	Macrosialin (mouse) CD68 (human)	OxLDL OxLDL	Mph	Highly glycosylated
E	LOX-1	OxLDL	EC, Mph, SMC	C-Type lectin
F	SREC	AcLDL	EC	Two isoforms (SREC-I, SREC-II)
Others	CL-P1 SROX-PS	OxLDL OxLDL, PS	EC Mph (THP-1)	Collectin family

Abbreviations: Mph; macrophages, EC; endothelial cells, SMC; smooth muscle cells, AcLDL; acetylated LDL, OxLDL; oxidized LDL, PS; phosphatidylserine, OxPC; oxidized phosphatidylcholine

Tableau I-8: Liste des différentes classes de récepteurs « scavenger » avec leur distribution cellulaire et leurs caractéristiques majeures (Itabe 2003).

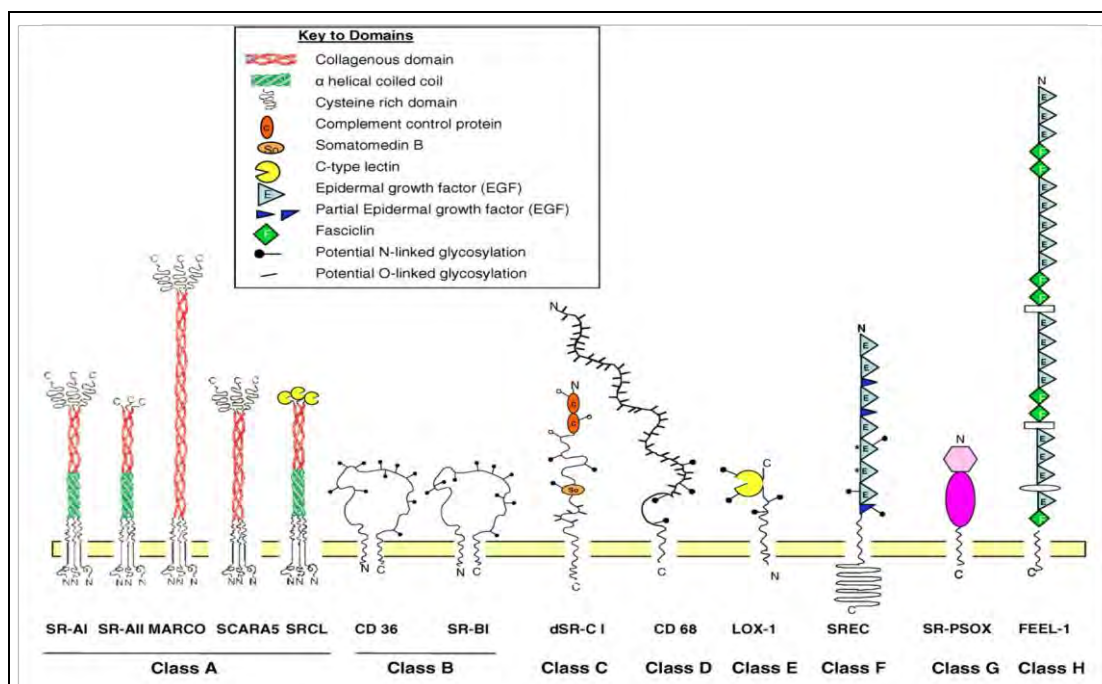


Figure I-15: Représentation des différentes familles de récepteurs « scavenger » avec leurs domaines extracellulaires (Pluddemann, Neyen *et al.* 2007).

Des marquages immunocytochimiques ont démontré la présence de MPO dans les lésions athéromateuses humaines ainsi que dans le cœur nécrotique de certaines plaques en phase de rupture, et d'autres études faisant appel à la spectrométrie de masse ont montré que des produits d'oxydation générés par la MPO sont enrichis dans les athéromes humaines (Zhang, Brennan et al. 2001; Malle, Marsche et al. 2006; Takeshita, Byun et al. 2006). Ainsi la myéloperoxydase pourrait être impliquée dans l'oxydation des LDL *in vivo*, convertissant les lipoprotéines en une forme reconnue par les récepteurs « scavenger » des macrophages, favorisant l'internalisation de lipides et donc la formation de cellules spumeuses. La MPO a également été associée à d'autres désordres dont certaines anomalies rénales, certains cancers, et même des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer.

Etant donné que les LDL oxydées à la MPO, sont encore peu étudiées, dans ce travail, nous comparerons les effets de LDL oxydées au Cu (OxLDL) et celles oxydées à la MPO (MoxLDL) dans un modèle de cellules endothéliales en culture (Voir Objectif du travail, paragraphe 5).

3.3. Récepteurs aux LDL oxydées

Les LDL natives sont reconnues par le récepteur spécifique aux LDL (LDL-R) exprimé au niveau du foie, mais aussi par les cellules endothéliales, les monocytes, les macrophages et les cellules musculaires lisses au niveau des lésions athérosclérotiques. Comme déjà signalé, ce récepteur est régulé via le facteur SREBP. Par contre, les LDL une fois modifiées au niveau de la fraction protéinique ne sont plus reconnues par le R-LDL, mais par les récepteurs de type « scavenger » de différentes classes (Gleissner, Leitinger et al. 2007).

Brown et Goldstein ont découvert que l'acétylation des LDL conduisait à une capture importante de cholestérol et à la formation de cellules spumeuses via un récepteur spécifique nommé « acetyl-LDL receptor », identifié plus tard par Steinberg *et al* comme un des membres de la famille des récepteurs « scavenger » présents dans les macrophages et dans d'autres types cellulaires. Ces récepteurs « scavenger » seraient donc responsables de la capture des LDL oxydées, contrairement au LDL natives internalisées spécifiquement par le récepteur aux LDL (Itabe 2003; Pluddemann, Neyen et al. 2007). De plus, Brown et Goldstein ont mis en évidence que d'autres modifications des LDL pouvaient faciliter la reconnaissance par ce type de récepteurs. Par contre, les LDL peu modifiées (mmLDL ou minimally modified LDL), n'étant oxydées qu'au niveau des lipides, sont toujours reconnues par les récepteurs aux LDL natives et non par les récepteurs « scavenger ».

Après cette découverte par Brown and Goldstein, les récepteurs « scavenger » ont été de plus en plus étudiés. Sur base de la structure en domaines, on a établi 8 classes de récepteurs « scavenger »: A, B, C, D, E, F, G et H (Itabe 2003; Pluddemann, Neyen et al. 2007). La liste des différents récepteurs « scavenger » et leurs ligands ainsi que leur structure sont reprises respectivement au Tableau I-8 et à la Figure I-15.

Le premier récepteur « scavenger » isolé par Kodama *et al* a été le SR-A (récepteur scavenger de la classe A). Cette glycoprotéine de 200 kDa, reconnaît le groupement acétyl des LDL acétylées, les LDL oxydées au Cu, le lipide A, du dextran sulfate. Au sein de la classe B on retrouve le SR-BI, récepteur liant les LDL oxydées au Cu, mais aussi les HDL (natives) et le CD36. Ce dernier a d'abord été identifié comme une glycoprotéine membranaire réceptrice plaquettaire pour la thrombospondine-1, puis comme liant les LDL oxydées. CD36 est une glycoprotéine hautement glycosylée de 53 kDa avec des domaines N et C terminaux transmembranaires, caractéristiques des récepteurs « scavenger » de classe B. Cependant, selon le type cellulaire, les types et le nombre de récepteurs « scavenger » varient. En effet, bien que les macrophages expriment un grand nombre de récepteurs « scavenger » comme SR-A, SR-BI, CD36, CD68, le « lectin like oxLDL receptor » (LOX-I)

Transcription factor	Cell type	Involvement of oxidative stress	Active compounds	Expressed genes	Role of the transcription factor
<i>Proinflammatory</i>					
AP1	VSMC [21] Endothelial cells [22] Mesangial cells [28]	+	LysoPC Lip Ext TGFβ		Cytokine synthesis [15–18] Oxidative stress response [19]
NF-κB	Endothelial cells [36] Fibroblasts, SMC, endothelial cells [37] Macrophages [38] VSMC [39] VSMC [40] Chondrocytes [42]	+	Lip Ext LysoPC 13HODE	VCAM	Proinflammatory [29] Proatherosclerotic [32,33]
STAT1/3 NFAT	Endothelial cells [57] T lymphocytes, fibroblasts Endothelial cells, macrophages [70]	+	Lip Ext		Cytokine transduction [47] Cytokine synthesis [63] Development of cardiovascular system [64]
HIFα	Macrophages [81]	+	Lip Ext	VEGF	Angiogenesis [75] Plaque rupture [79] Foam cell formation [82] Expression of adhesion molecules [83]
Sp1	VSMC [92] Mesangial cells [93]	+	7ketoCs	Tissue factor Fibronectin	
<i>Anti-inflammatory</i>					
PPARα and γ	Macrophages [105]			ABCA1, MCP1	Anti-inflammatory [94]; cholesterol efflux [100] Antiatherogenic [102]
PPARα PPARγ	Endothelial cells [104] Macrophages [109] Macrophages, endothelial cells [111] Monocytes [114] Chondrocytes [112] Mesangial cells [123]		9/13HODE 9/13HODE AlkylPC	CD36, IL4 VEGF	Anti-inflammatory [106,107] Inhibition of foam cell formation [115]
Smad3 Nrf2	Macrophages [137] VSMC [138]	+	4-HNE	VEGF PAI-1 CD36, redoxin Heme-oxygenase	Antiatherogenic [119] Oxidative stress response [124] Anti-inflammatory [135]
<i>Tumor suppressor</i>					
P53	Macrophages [144] Fibroblasts [140] Endothelial cells [143]	+	Lip Ext		Antiatherosclerotic [145]

Lip Ext: Lipid Extract of CuLDL.

Tableau I-9: Facteurs de transcription activés par les LDL oxydées (Maziere and Maziere 2009).

et le récepteur « scavenger » liant la phosphatidylsérine (SR-PSOX), SR-A et CD36 apparaissent comme les principaux récepteurs responsables de la formation de cellules spumeuses (Itabe 2003; Matsuura, Kobayashi et al. 2006). Par contre, les cellules endothéliales en expriment beaucoup moins. Sawamura et Kume ont identifié pour la première fois, LOX-1, un récepteur spécifique de LDL oxydées exprimé par les cellules endothéliales (Sawamura, Kume et al. 1997). D'autres récepteurs exprimés par les cellules endothéliales ont ensuite été découverts par Adachi *et al.*, SREC-I et SREC-II, mais ne lieraient que les LDL acétylées et non les LDL oxydées (Adachi, Tsujimoto et al. 1997). L'équipe de Ohtani *et al.* a également identifié un nouveau récepteur « scavenger » exprimé spécifiquement par les cellules endothéliales, CL-P1 (Ohtani, Suzuki et al. 2001). Si les récepteurs liant les OxLDL sont bien identifiés, ceux liant les MoxLDL restent mal définis.

4. Voies de signalisation activées par le stress oxydatif

Une accumulation intracellulaire excessive de ROS peut induire la dérégulation des fonctions biologiques normales, mais aussi des dommages cellulaires importants. Mais les ROS peuvent également servir de messagers secondaires. En effet, les cellules eucaryotes ont développé une capacité adaptative à répondre à un stress oxydatif par l'activation de voies de signalisation afin de maintenir une certaine homéostasie redox et de contrer les effets néfastes des ROS. Le stress oxydatifs activent aussi bien des facteurs de transcription pro-inflammatoires comme NFκB (Nuclear factor κ of B cells) et AP-1 (Activator protein-1) que des facteurs anti-inflammatoires comme Nrf2 (Nuclear factor erythroid related factor-2) (Ma, 2010). Les facteurs dont Nrf2, AP-1, des protéines de la voie des MAP kinases (ERK 1/2), la protéine kinase B (Akt) et NFκB, ... activés suite à des stress oxydatifs endogènes ou exogènes, semblent favoriser la survie cellulaire tandis que l'activation prolongée de la c-jun N-terminal kinase (JNK) et de la kinase p38 conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'à l'induction de l'apoptose (Niture, Kaspar et al. 2010).

Les LDL oxydées peuvent provoquer un stress oxydatif, comme l'ont montré Calay *et al* (Calay, Rousseau et al. 2010) sur les macrophages murins RAW 264.6 et Mazière et Mazière (Maziere and Maziere 2009), dans une revue récente, ont décrit les kinases et facteurs de transcription principaux activés par les LDL oxydées (Tableau I-9).

4.1.1. Voie Nrf2

La voie Nrf2 semble être la voie la plus importante déclenchée en réponse à un stress oxydatif modéré ou électrophile. En effet, cette voie est enclenchée via divers oxydants comme le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux ou l'oxyde nitrique ou par l'exposition à des métaux toxiques comme le chrome ou des radiations (Dhakshinamoorthy and Jaiswal 2000; Niture, Kaspar et al. 2010). La voie Nrf2, jouant un rôle important dans la protection contre les dommages engendrés par les stress oxydatifs, est responsable de la transcription de gènes codant pour des enzymes de détoxification de phase II et des protéines antioxydantes via sa liaison à la séquence ARE (antioxidant response element) dans la région promotrice de gènes antioxydants et détoxifiants de phase II comme l'hème oxygénase 1 (HO-1), la NAD(P)H :quinone oxydoréductase 1 (NQO1), la glutathione-S-transférase (GST), certaines glutathion peroxydases, la glutathion réductase, les sous-unités de la glutathione cystéine ligase (Gcl) et les thiorédoxine réductases (Mann, Niehueser-Saran et al. 2007; Kaspar, Niture et al. 2009).

Les Nrfs ou les « NF-E2-related factors », faisant partie de la famille des protéines « basic leucine zipper » (bZIP) possèdent trois membres : Nrf2 et son homologue, Nrf1, tous deux de

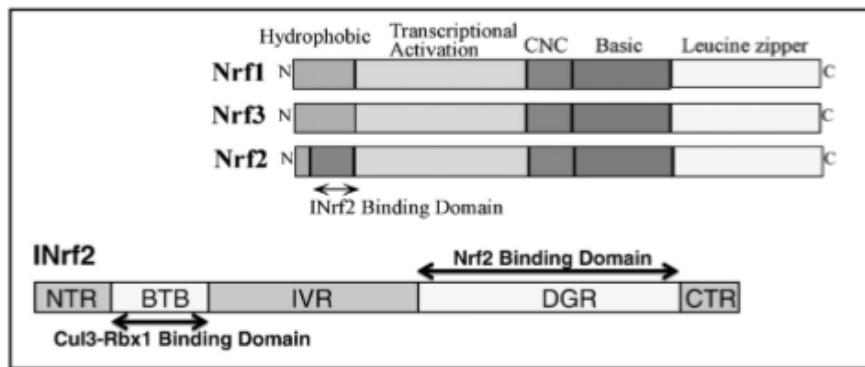


Figure I-16: Représentation schématisée des différents domaines de la famille Nrf (Nrf1, Nrf2 et Nrf3) et de INrf2, l'inhibiteur de Nrf2. Les 3 facteurs Nrf possèdent la même structure à l'exception de Nrf2, qui possède une domaine de liaison à INrf2. L'inhibiteur de Nrf2 est composé de 5 domaines : NTR, N-terminal region ; BTB, broad complex ; IVR, intervening/linker region ; DRG, Kelch domaine/ diglycine repeats et CTR, CTR, C-terminal region et ne se lie qu'à Nrf2. (Kaspar, Nitire et al. 2009).

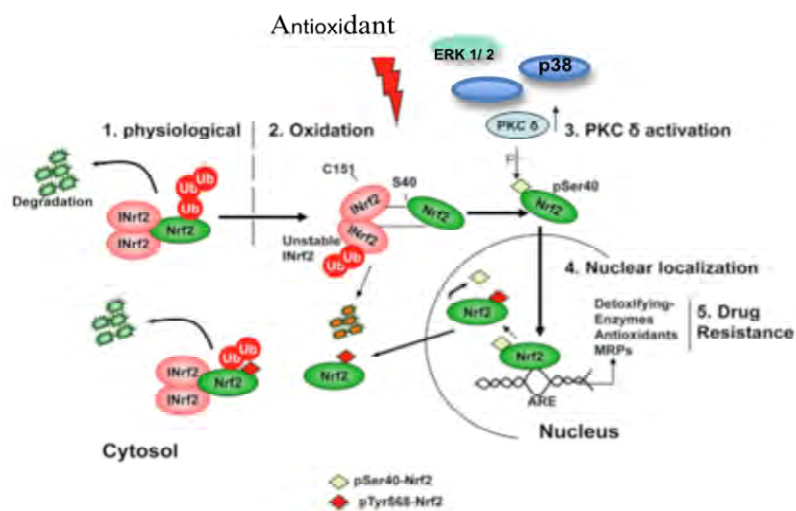


Figure I-17: Représentation schématisée de la voie Nrf2, (adapté à partir de (Nitire, Jain et al. 2009))

poids moléculaire de 66-68 kDa et Nrf3, antagoniste de Nrf2. Parmi ces 3 facteurs, Nrf2 semble être le facteur prédominant de l'activation de l'expression des gènes médiée par les sites ARE (Niture, Kaspar et al. 2010). La structure de ces 3 membres est reprise à la Figure I-16. Une région basique en amont de la région leucine zipper est responsable de la liaison à l'ADN et seul Nrf2 possède un site de liaison à INrf2 (ou KEAP-1). Ces Nrfs possèdent également une région hautement conservée, dont la fonction reste inconnue, nommée « cap'n'collar » (CNC) pour son homologie avec la protéine cap'n'collar de la drosophile (Jaiswal 2004; Niture, Kaspar et al. 2010). Dans la suite de cette introduction, nous nous focaliserons sur Nrf2 dont la voie est représentée en Figure I-17.

En condition basale, Nrf2 est séquestré dans le cytoplasme grâce à son interaction avec son inhibiteur, KEAP-1 (Kelch-like ECH associated protein 1) ou INrf2, une protéine liant l'actine, régulant la localisation de Nrf2 en s'y liant au domaine N-terminal Neh2. Ce complexe Nrf2:INrf2 est alors reconnu par une ubiquitine ligase, le complexe Cul3-Rbx1, qui permet l'ubiquitinylation de Nrf2 et sa dégradation par le protéasome. Cependant, en condition de stress oxydatif, Nrf2 est activé, se dissocie de son inhibiteur et est transloqué dans le noyau. De plus, diverses recherches ont montré que des modifications post-traductionnelles de Nrf2 et/ou de son inhibiteur pouvait conduire à la dissociation du complexe Nrf2:INrf2. En effet, des modifications au niveau des nombreux résidus cystéines de KEAP-1 dont la cystéine 151, 273 et 288 permettent un changement de conformation de l'inhibiteur conduisant à la libération du facteur de transcription Nrf2 (Maher and Yamamoto 2010). Cependant, il est de plus en plus mis en évidence que la présence de diverses kinases comme certaines isoformes de protéine kinase C (PKC) ou des membres de la voie des mitogen-activated protein kinases (MAPK) comme les « extracellular signal-regulated kinases 1/ 2 » (ERK 1/2), p38, la « c-Jun NH2-terminal kinase » (JNK), ou encore la caséine kinase 2 (CK2), ... permettent la phosphorylation, l'activation et la stabilisation de Nrf2 facilitant sa migration dans le noyau et ainsi la régulation de l'expression génique médiée par les sites ARE (Bloom and Jaiswal 2003; Jaiswal 2004; Anwar, Li et al. 2005; Afonyushkin, Oskolkova et al. 2010; Niture, Kaspar et al. 2010). Par exemple, la phosphorylation du résidu sérine 40 dans le domaine Neh2 de Nrf2, interagissant avec INrf2, par la PKC permet la dissociation des deux membres. D'autres études ont également montré que Nrf2 pouvait être phosphorylé par PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase), une kinase importante dans la voie UPR (Unfolded Protein Response) au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui favoriserait la translocation nucléaire de Nrf2 (Bloom and Jaiswal 2003; Cullinan, Zhang et al. 2003). Le mode d'activation de Nrf2 pourrait varier de cellule à cellule avec une prépondérance variable des phosphorylations en fonction du type cellulaire. Une fois dans le noyau, Nrf2 s'hétérodimérise avec une petite protéine Maf (MafG, MafK et MafF) faisant partie d'une famille de facteurs de transcription nucléaires agissant comme répresseurs ou activateurs de nombreux gènes eucaryotes en homodimères ou hétérodimères avec Jun (c-Jun, Jun-D et Jun-B) (Jaiswal 2004). Ce complexe Nrf2/Maf se lie alors à l'ADN via la séquence consensus ARE et plus précisément au niveau de la séquence GCTCAGTCA, une séquence « enhancer » présente dans les régions promotrices de gènes codant pour des enzymes de détoxification de phase II ainsi que pour des protéines antioxydantes. Cette liaison induit la transcription d'une variété de gènes comme la NAD(P)H quinone oxydo-réductase (NQO1), la glutathione S-transférase (GST), certaines glutathion peroxydases et réductase, l'hème oxygénase 1 (HO-1), et la sous-unité régulatrice de la glutamate-cystéine ligase (GlcM) (Kensler and Wakabayashi 2010). Au niveau nucléaire, la voie Nrf2 est également régulée négativement. En condition basale, Bach-1, une protéine nucléaire, est en compétition avec Nrf2 pour la liaison à la séquence ARE conduisant à la répression des gènes contenant le motif ARE. Cependant, en conditions oxydantes, Bach-1, un répresseur transcriptionnel, se dissocie de ARE et permet la liaison de Nrf2. En effet, des ROS peuvent venir attaquer les groupements sulfhydryle de Bach1, inhibant sa liaison avec ARE et

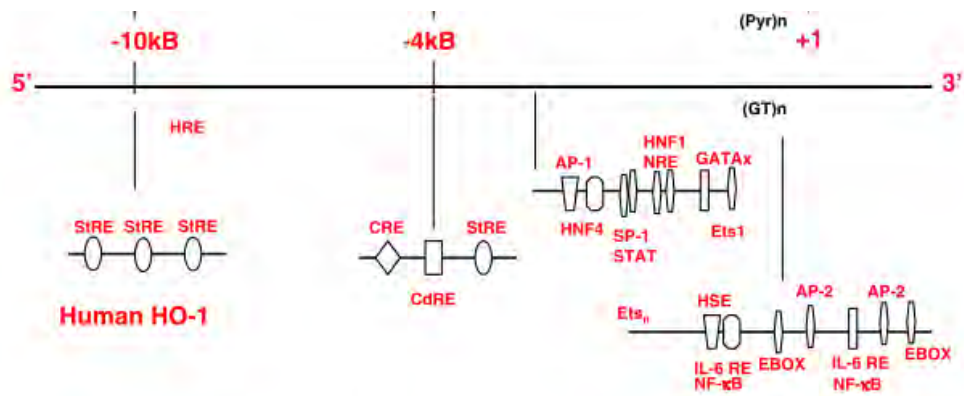


Figure I-18: Structure du promoteur *hox1* humain, adapté à partir de (Ryter, Alam et al. 2006).

favorisant son transport hors du noyau, sa polyubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. Ce système de « switch on » et « switch off » de Nrf2 permet de protéger les cellules contre les dommages induits par les radicaux libres, de prévenir l'apoptose et de favoriser la survie cellulaire (Gozzelino, Jeney et al. 2010; Niture, Kaspar et al. 2010).

En plus de la protection des cellules contre le stress oxydatif, l'activation de la voie Nrf2/ARE permet l'inhibition de l'expression de certains gènes inflammatoires. En effet, l'athérosclérose est caractérisée par une composante oxydative via les ROS, mais aussi par une composante inflammatoire via l'activation de diverses voies inflammatoires. De cette façon, l'activation de Nrf2 peut réprimer l'expression de gènes inflammatoires redox-sensibles et protéger les cellules endothéliales des stress oxydants. En effet, l'expression de Nrf2 réprime la transcription de VCAM-1 et de MCP-1 induite par le TNF- α sans l'inhibition de NF- κ B (Chen, Dodd et al. 2006; Zakkar, Van der Heiden et al. 2009).

4.1.2. Principaux gènes cibles de Nrf2

La **NQO-1**, est une flavoprotéine agissant en compétition avec la cytochrome p450 réductase et catalyse la réduction de deux électrons ainsi que la détoxification des quinones et autres complexes redox. La **Gclm** est l'unité régulatrice de l'enzyme limitante de la synthèse du glutathion, un tripeptide hydrosoluble à caractère antioxydant grâce à son groupement thiol et sert aussi de tampon redox à la cellule tandis que la **GST** est une enzyme du métabolisme du glutathion catalysant la conjugaison du GSH avec divers composés électrophiles endogènes et exogènes faisant partie de la famille des enzymes de détoxification de phase II.

Les **GPx** fonctionnent en association avec la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD) afin de protéger la cellule des dommages engendrés par les ROS. Les GPx détoxifient les peroxides avec le GSH, jouant le rôle de donneur d'électrons dans la réaction de réduction, produisant du GSSG comme produit final. La réduction de GSSG est catalysée par la GSH réductase (GSR) nécessitant le NADPH. La GPx est une protéine de 80 kDa composée de 4 sous-unités identiques. Cependant, 5 isoenzymes sont caractérisées chez les mammifères, GPx1 à GPx5 (Townsend, Tew et al. 2003) dont GPx2 et GPx3 sont induites par Nrf2 (Townsend, Tew et al. 2003; Kensler, Wakabayashi et al. 2007; Niture, Kaspar et al. 2010).

HO-1 est l'enzyme limitante de la dégradation de l'hème. Son rôle est discuté de manière détaillée dans le paragraphe suivant.

4.1.3. Les hèmes oxygénases

L'athérosclérose est favorisée lorsque les systèmes de défense antioxydants ne sont pas suffisamment induits dans la paroi vasculaire sous des stress oxydatifs et inflammatoires. L'HO-1 pourrait contribuer à la balance entre facteurs pro- et anti-oxydants en faveur des antioxydants à travers divers mécanismes. L'HO-1 permet de diminuer l'activité de NAD(P)H oxydase et plus précisément de diminuer l'expression de *gp91phox*, d'inhiber la transmigration des monocytes, ... mais permet aussi la formation de molécules anti-inflammatoires comme le monoxyde de carbone ou d'antioxydants, telle que la bilirubine.

Les hèmes oxygénases, existent sous trois isoformes HO-1, HO-2 et HO-3, codées respectivement par les gènes *hmox-1*, *hmox-2*. HO-1, une isoforme inductible de 32 kDa, est régulée transcriptionnellement de manière positive par divers types de stress oxydatifs dont les LDL oxydées, les rayons UV, mais aussi par l'hypoxie. HO-2 est exprimée constitutivement dans de nombreux organes mais ne répond à aucun inducteur de HO-1. HO-3, est démunie d'activité catalytique, possède une structure similaire à HO-2 et dériverait des transcrits de *hmox-2* par épissage alternatif (Morse and Choi 2002; Morita 2005). L'analyse

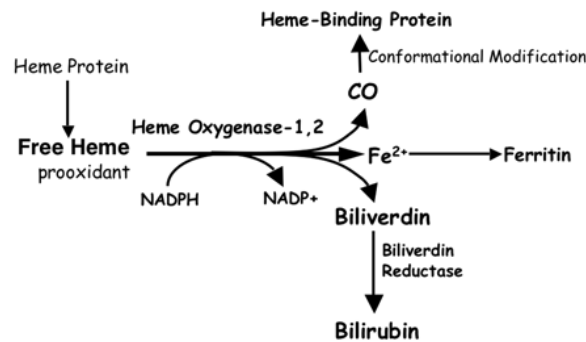


Figure I-19: Réaction catalysée par l'hème oxygénase (HO). Cette réaction schématise la conversion catalytique de l'hème en bilirubine, oxyde de carbone (CO) et Fer (Fe²⁺). La biliverdine est directement prise en charge par la biliverdine réductase et permet la formation de bilirubine, un puissant agent antioxydant excrété via l'urine. Le fer, lui, est capturé par la ferritine afin de le stocker (Morita 2005).

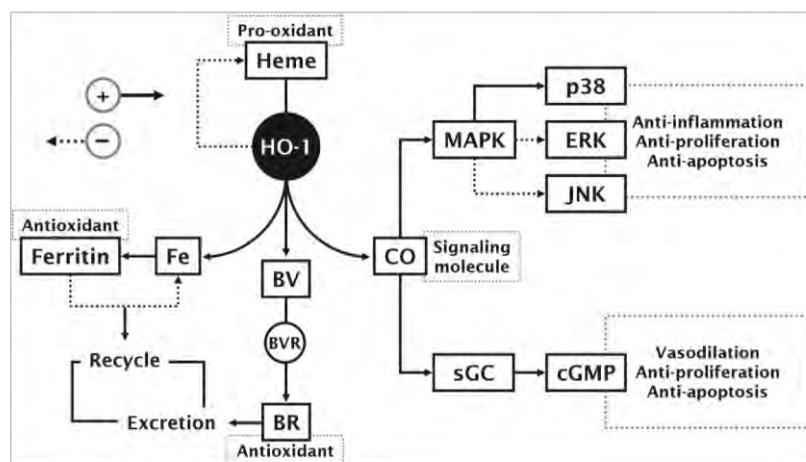


Figure I-20: Mode d'action de l'hème oxygénase et de ses produits de réaction (Pae, Kim et al. 2008).

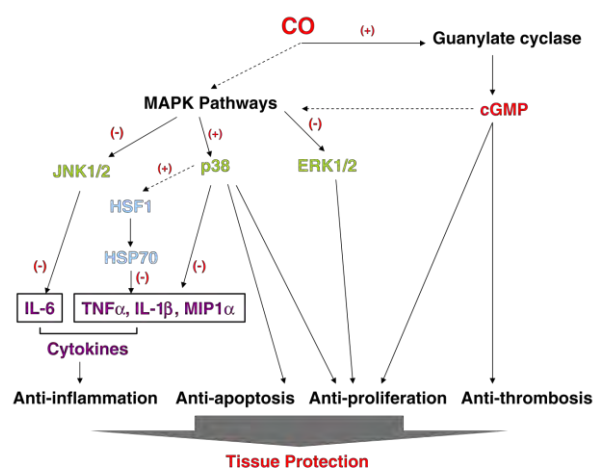


Figure I-21: Voies de signalisation activées par le CO conduisant à la protection tissulaire. Le monoxyde de carbone peut activer la guanylate cyclase soluble (sGC) conduisant à la production de cGMP. Le CO peut aussi moduler les protéines de la voie des MAP kinases dont p38 MAPK, ERK et JNK. Le CO régule négativement l'expression des cytokines pro-inflammatoires via la voie dépendant de p38 MAPK conduisant à un effet anti-inflammatoire. Le monoxyde de carbone exercerait également des effets anti-apoptotiques, anti-prolifératifs et anti-thrombotiques (Ryter, Alam et al. 2006).

des régions distales du gène *hmx-1* humain révèle une région « enhancer » située entre -3500 et -4500 pb, capable d'induire l'expression de *hmx-1* en réponse au cadmium, à la présence de groupements hémiques ou d'oxydants comme, par exemple, les phospholipides oxydés ou suite à un « shear stress ». Ce gène possède également dans ses régions distales des sites consensus pour AP-1. Un site de liaison pour NFκB existe aussi de -156 à -166 pb, se superposant à des sites putatifs de type IL-6 RE (responsive element) (Ryter, Alam et al. 2006). La structure du promoteur d'*hmx-1* est reprise à la Figure III- 18.

L'expression de HO-1 est observée tout au long du processus de développement de l'athérosclérose, de la strie lipidique à la rupture de la plaque. En effet, dans ces plaques, HO-1 se co-localise avec des phospholipides oxydés suggérant fortement que HO-1 est induit par des phospholipides oxydés *in vivo*.

L'hème oxygénase 1 a pour rôle de dégrader l'hème pro-oxydant et de produire des catabolites aux fonctions régulatrices ou protectrices. Les hèmes oxygénases catalysent la première étape de la dégradation de l'hème en biliverdine, fer et monoxyde de carbone intracellulaire. Cette réaction est schématisée à la Figure I-19 . Cette réaction nécessite de l'oxygène et se déroule en association avec la cytochrome réductase, fournissant les électrons afin de réduire l'hème ferrique ou pour activer l'oxygène.

Les HO et leurs métabolites jouent des rôles vitaux dans la régulation de réponses biologiques importantes dont l'inflammation, le stress oxydatif, la survie et la prolifération cellulaire (Figure I-20).

La biliverdine et la bilirubine sont les principaux produits de la dégradation de l'hème. A hautes concentrations, ces produits peuvent être toxiques. La bilirubine aurait un rôle d'antioxydant et serait anti-athérogène via son effet inhibiteur de l'oxydation des LDL et de « scavenger » de ROS. Le mécanisme par lequel la bilirubine interagit avec les ROS n'est pas encore complètement compris, cependant il semblerait que ses structures tétrapyroles hydrophobes inhibent l'activation des NADPH oxydases. (Morse and Choi 2002; Pae, Kim et al. 2008).

Le CO est un autre produit de la dégradation de l'hème. Celui-ci exerce des effets bénéfiques et joue un rôle physiologique dans la vasodilatation vasculaire, en parallèle au NO. Le CO se lie au groupement hème de la guanylate cyclase soluble (sGC) et active l'enzyme, ce qui augmente le niveau intracellulaire de guanine monophosphate cyclique (cGMP) induisant une relaxation vasculaire protectrice. Ainsi, le CO aurait, dans les larges vaisseaux comme l'aorte, un rôle de régulateur physiologique de la pression artérielle via des réponses médiées par le cGMP tandis que dans les petites artères et artérioles, il aurait un rôle vaso-dilatateur via l'activation des canaux potassium calcium-dépendants (Morse and Choi 2002; Morita 2005). Le CO permet également l'activation de la MAPK p38, permettant la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et le ralentissement de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Pae, Kim et al. 2008). De cette façon, le CO possède des propriétés anti-inflammatoires et constitue un vasodilatateur efficace dans l'athérosclérose lorsque la régulation de la pression vasculaire par l'oxyde nitrique endothélial est réduite (Anwar, Li et al. 2005; Morita 2005). Les fonctions du CO sont détaillées à la Figure I-21.

L'HO-1 permet aussi la libération de Fe^{2+} , une molécule pro-oxydative, à partir de l'hème, conduisant à une expression rapide de la ferritine, protéine extracellulaire hautement conservée liant le fer . Cette capture du fer par la ferritine permet ainsi de limiter le pouvoir pro-oxydant du fer. De cette façon, lorsque le taux de fer est bas, la synthèse de ferritine est

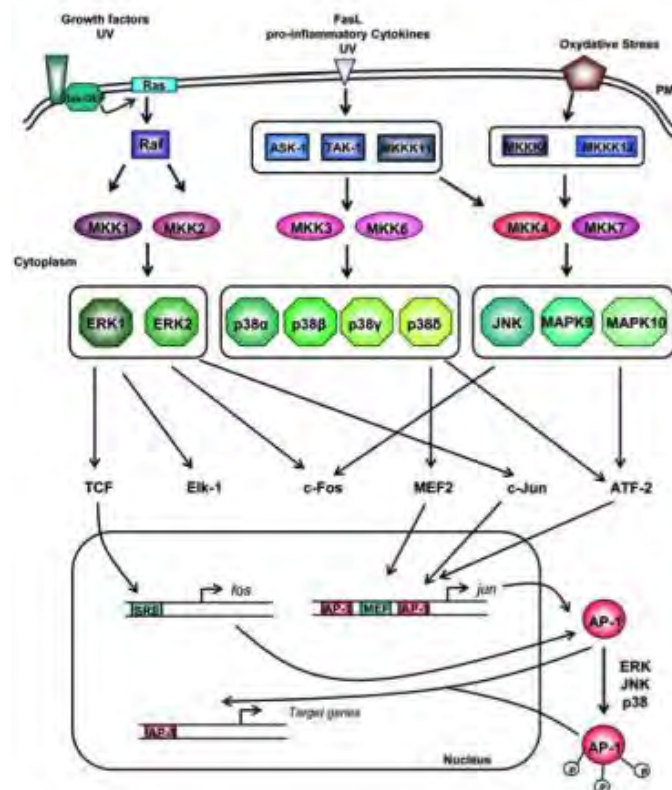


Figure I-22: Représentation de la voie d'activation de AP-1 (Herbein, Varin et al. 2006).

diminuée et inversement, lorsque le niveau de fer est haut, la synthèse de ferritine est augmentée (Morita 2005; Pae, Kim et al. 2008).

En plus de la séquence ARE reconnue par Nrf2, de nombreux éléments régulateurs ont été identifiés au niveau du promoteur de *hmx-1* dont des sites de liaison pour des facteurs de transcription activés en réponse aux stress oxydatifs comme NFκB, et AP-1 que nous allons rapidement présenter dans les paragraphes suivants (Morse and Choi 2002; Alam and Cook 2007).

4.2. La voie AP-1 (Activator protein-1)

AP-1 est un facteur de transcription dimérique composé par combinaison des membres de deux familles de protéines, Fos et Jun. La famille Fos comporte 4 membres (c-Fos, FosB, Fra-1 et Fra-2) pouvant uniquement s'hétérodimériser tandis que la famille Jun en possède 3 (c-Jun, JunB et JunD) qui peuvent soit s'homodimériser, soit s'hétérodimériser avec un membre de la famille Fos. De plus, certains membres des familles ATF (activating transcription factor) et CREB (cAMP response element-binding protein) peuvent aussi se dimériser avec les membres de la famille AP-1. Les membres de ces familles peuvent s'hétérodimériser et former un complexe AP-1 fonctionnel (Maziere and Maziere 2009).

Les protéines formant AP-1 possèdent une caractéristique commune, un domaine bZIP, un domaine basique liant l'ADN interagissant une région leucine zipper responsable de la dimérisation (Hess, Angel et al. 2004). L'activité d'AP-1 est régulée par de nombreux stimuli physiologiques et pathologiques comme les cytokines, les facteurs de croissance, l'état redox de la cellule, les stress dont les ROS ou encore les infections. En effet, l'activité transcriptionnelle d'AP-1 est stimulée par la présence de ROS dans le cytoplasme, activant le voies des MAPKines (JNK, ERK et p38) qui phosphorylent les résidus sérines d'AP-1 et l'activent (Figure I-22) (Pour revue voir : (Dalton, Shertzer et al. 1999; Ma 2010).

La voie AP-1 est activée par la cascade des MAPK par et par la phosphorylation de Jun et Fos et par l'induction de la transcription des gènes codant pour Fos et Jun. De cette façon, un stress induit la phosphorylation et l'activation de Jun par la cascade JNK. Les JNKs, membres de la superfamille des MAPK kinases sont présentes sous 3 isoformes JNK1, 2 et 3. Activées par la cascade des MAPK, les JNKs sont transloquées dans le noyau où elles phosphorylent les domaines activateurs de Jun au niveau des résidus Ser63 et Ser73 permettant son activation. Cependant, les kinases par lesquelles l'activité de Fos est régulée ne sont pas encore exactement connues. Plusieurs candidats ont été proposés : FRK (Fos-related kinase), RSK (ribosomal S6 kinase) et ERK 1/ 2. AP-1 une fois dans le noyau, il se lie via les domaines basiques à une séquence spécifique d'ADN, TGAC/GTCA, connue sous le nom de TRE (TPA-responsive element) ou site AP-1 situé dans la région promotrice de nombreux gènes impliqués dans la croissance cellulaire et le contrôle du cycle cellulaire. De plus, ce facteur contrôle l'expression de cytokines inflammatoires comme TNF-α et IL-1β et l'ostéopontine. AP-1 module également le taux de cholestérol intracellulaire en régulant l'expression de l'ATPase ABCA1 (ATP-binding cassette 1), un transporteur membranaire facilitant l'efflux de cholestérol (Herr and DeBatin 2001; Herbein, Varin et al. 2006). De plus, le facteur de transcription AP-1, connu pour être redox-sensible, permet l'activation d'une série de gènes impliqués dans la réponse adaptative au stress oxydatif, dont *hmx-1*.

4.3. La voie NFκB (Nuclear factor κ of B cells)

NFκB joue un rôle important dans les processus inflammatoires et est reconnu depuis longtemps pour être activé en cas de stress oxydatifs. NFκB est aussi impliqué dans la

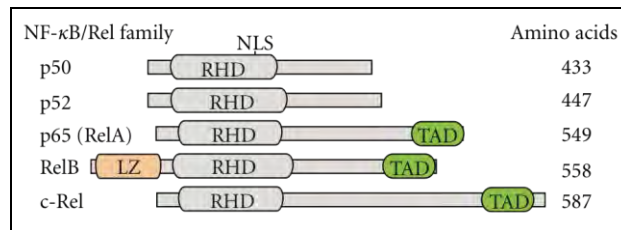


Figure I-23: Structure des membres de la famille NF- κ B. Les 5 membres possèdent un domaine « rel homology » (RHD) unique et hautement conservé du côté N-terminal, contenant une séquence NLS. Certains (p65, RelB et c-Rel) possèdent un domaine transactivateur (TAD) du côté N-terminal leur conférant une activité transcriptionnelle. De plus, RelB est le seul à posséder une région « leucine zipper-like » (LZ) en N-terminal (Majdalawieh and Ro 2010).

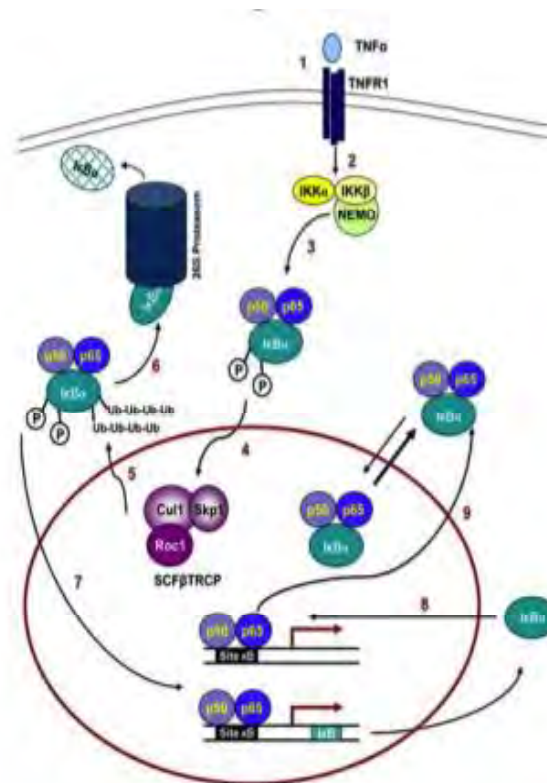


Figure I-24: Représentation de la voie d'activation de NF- κ B (Herbein, Varin et al. 2006).

progression de l'athérosclérose et notamment dans l'initiation de l'adhérence des monocytes, la formation de cellules spumeuses, et l'inflammation. De plus, l'implication de NFκB dans l'athérosclérose a été démontrée par la présence de ce facteur de transcription, sous la forme activée, dans les plaques mais aussi la réduction de la formation de cellules spumeuses suite à une inhibition de NFκB (Herr and Debatin 2001; Monaco and Paleolog 2004).

La famille des facteurs de transcription NFκB se compose de 5 membres ; p50, p52, c-Rel, Rel-A (ou p65) et Rel-B, possédant tous un domaine N-Terminal « rel-homology » conservé, mais seuls les trois derniers sont transcriptionnellement actifs. Chaque membre, à l'exception de RelB, peut s'homodimériser ou s'hétérodimériser, cependant la forme active la plus fréquente est l'hétérodimère p50/p65, contenant les domaines de transactivation nécessaires. L'organisation structurelle des différents membres de la famille NFκB est illustrée à la Figure I-23 (Majdalawieh and Ro 2010).

En condition basale, NFκB est maintenu dans le cytoplasme grâce à son interaction avec des protéines régulatrices inhibitrices de κB (IκB), dont les plus importantes sont IκBα, IκBβ et IκBε. Cependant, une variété de stimuli externes peut activer NFκB, dont des cytokines, des pathogènes, le stress oxydatif et, les ROS ou des LDL oxydées en induisant la phosphorylation et la dégradation de son inhibiteur, permettant alors la libération du facteur de transcription et sa translocation dans le noyau (Monaco and Paleolog 2004) (Pour revue voir (Ma 2010)). La phosphorylation de IκB est médiée par un complexe protéique, IKK (IκB kinase) composé de 3 sous-unités dont deux kinases, IKK-α (IKK-1) et IKK-β (IKK-2) et une sous-unité régulatrice IKK-γ (NEMO). Une fois phosphorylé, IκB est ubiquitinylé et dégradé par le protéasome, libérant ainsi le facteur de transcription de son inhibiteur. Une fois dans le noyau, NFκB se fixe au site consensus κB du promoteur, caractérisé par la séquence GGGRNYYCC (R = purine, A ou G, Y = pyrimidine, C ou T et N = n'importe quel nucléotide) (Monaco and Paleolog 2004; de Winther, Kanters et al. 2005) et induit la transcription des gènes cibles (Figure I-24). Parmi ces gènes, on retrouve des gènes codant pour des cytokines (dont le TNF-α, l'IL-6 et l'IL-8), des récepteurs de cytokines, des molécules d'adhérence (E-sélectine, VCAM-1, ICAM-1, ...), des facteurs de transcription, mais aussi des gènes impliqués dans la réponse adaptative au stress oxydatif, comme *hmx-1*. De plus, certains gènes cibles de NFκB possèdent une activité anti-apoptotique comme les protéines inhibitrices de caspases dont TRAF1 et TRAF2, supprimant l'activation de la caspase-8, mais d'autres favorisent l'apoptose via l'induction de récepteurs de mort (TRAIL, CD95, DR4 et DR5) et de leurs ligands (tels CD95-L, TNF-α) (Herr and Debatin 2001; Tak and Firestein 2001).

4.4. La voie UPR (Unfolded protein response)

Le réticulum endoplasmique (RE) est une organelle assurant des fonctions importantes dont les modifications post-traductionnelles ainsi que le folding des protéines de la voie sécrétoire, la régulation de l'homéostasie du calcium, la synthèse des lipides, ... Cependant, des stress de nature variable (stress oxydatifs, hypoxie, ...) peuvent conduire à l'accumulation de protéines mal (ou non) repliées dans le RE et ainsi perturber ses fonctions. En effet, en présence d'oxystérols, de cholestérol intracellulaire en abondance et d'acides gras saturés, en cas de stress oxydatif ou de perturbation de l'homéostasie du calcium, des senseurs transmembranaires du RE détectent l'accumulation des protéines anormales et initient la réponse UPR. De plus, si le stress encouru par le RE persiste ou s'intensifie, la réponse UPR peut conduire à la mort cellulaire, et en particulier à l'apoptose. Des études récentes ont suggéré que cette réponse adaptative était impliquée dans de nombreuses pathologies

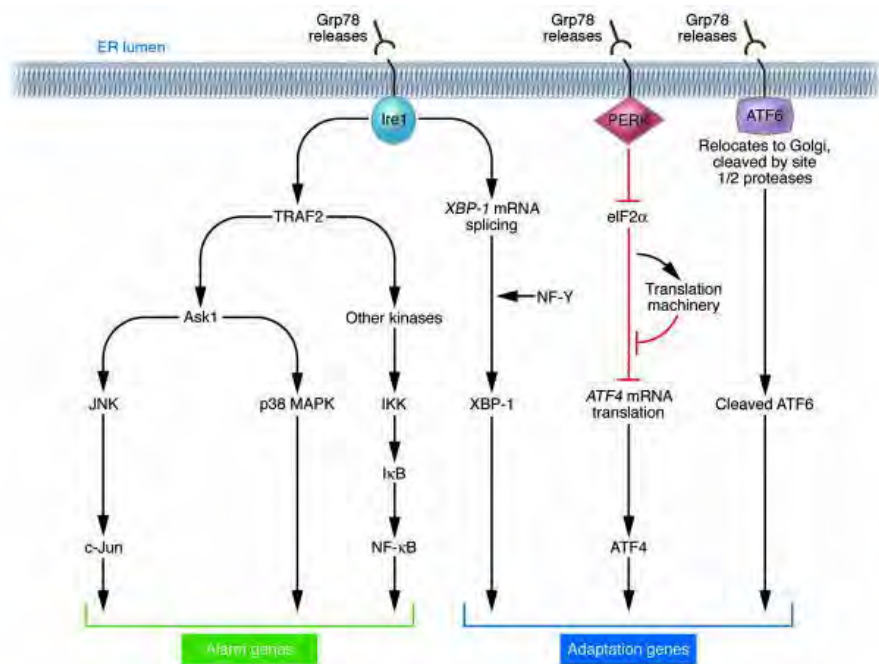


Figure I-25: Représentation de la voie UPR. Trois senseurs transmembranaires du RE, à savoir PERK, ATF-6 et IRE1, sont maintenus dans un état inactif dans le RE grâce à leur interaction avec la chaperonne Bip/grp78. En condition de stress, Bip se détache de ces senseurs au profit des protéines mal repliées. Cette dissociation les active et initie la réponse UPR. PERK s'autophosphoryle, ce qui stimule son activité kinase. PERK phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α , induisant une diminution, voire une inhibition, de la traduction générale sauf celle d'ATF4. ATF4 est un facteur de transcription induisant plusieurs gènes codant entre autres pour des chaperones. ATF-6 migre du RE au Golgi où il subit un double clivage protéolytique par deux protéases, S1P et S2P. ATF-6 devenu fonctionnel, il migre dans le noyau où il induira l'expression de gènes clefs de l'UPR. IRE1 se dimérise et acquiert une activité d'endoribonucléase ligase qui lui permettant d'assurer l'épissage de l'ARN messager de XBP-1. IRE1 peut également se lier à TRAF2 afin d'activer des kinases impliquées dans la réponse immunitaire et inflammatoire dont Ask1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) et des kinases interagissant avec la voie NF- κ B (Xu, Bailly-Maitre et al. 2005).

humaines dont les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, ... (Xu, Bailly-Maitre et al. 2005; Tabas 2010).

En condition basale, trois senseurs transmembranaires du RE, à savoir PERK, ATF-6 et IRE1, sont maintenus dans un état inactif dans le RE grâce à leur interaction avec la chaperone Bip/Grp78 (78 kDa glucose-regulated protein). Cependant, en condition de stress, Bip se lie préférentiellement aux protéines mal repliées qui s'accumulent et se détache donc de ces 3 senseurs transmembranaires, à la fois en contact avec la lumière du RE et le cytosol, ce qui les active et initie la réponse UPR. Chacune des 3 protéines entre alors dans une voie de signalisation distincte permettant à la cellule de s'adapter au stress encouru dans le but de restaurer l'homéostasie cellulaire (Figure I-25) (Xu, Bailly-Maitre et al. 2005; Fofonova and Ferre 2007).

4.4.1. PERK (RNA-dependent protein kinase-like ER kinase)

Une fois libérée de Bip, PERK, une sérine thréonine kinase, se dimérise, ce qui induit son autophosphorylation et stimule son activité kinase. Cette capacité lui permet alors de phosphoryler et d'inactiver le facteur d'initiation de la traduction, eIF2 α . Cette modification empêche la formation du complexe de pré-initiation de la traduction entraînant une diminution, voire une inhibition, de la traduction générale tout en permettant la traduction de certaines protéines impliquées dans la réponse UPR, dont ATF4, un facteur de transcription impliqué dans la synthèse de chaperones et de protéines permettant de restaurer un équilibre au sein du RE. En plus d'être liée à l'UPR, PERK médie également la phosphorylation du facteur de transcription Nrf2, qui est alors transloqué dans le noyau afin d'induire la transcription de gènes impliqués dans la régulation de l'état redox de la cellule (Zhao and Ackerman 2006). En effet, cette phosphorylation favoriserait la dissociation du complexe Nrf2/Keap1 et inhibe la réassociation de ces deux protéines (Cullinan, Zhang et al. 2003; Cullinan and Diehl 2004). La protéine PERK joue donc un rôle dans la survie cellulaire via l'activation d'ATF4 et de Nrf2.

4.4.2. ATF-6 (Activating Transcription Factor 6)

ATF-6, une fois libéré, migre du RE au Golgi où il subit un double clivage protéolytique par deux protéases, S1P et S2P (site 1 and 2 proteases). Ce clivage au niveau du domaine juxtamembranaire d'ATF-6 donne naissance à la forme active du facteur de transcription ATF-6 de 50 kDa, relarguée dans le cytosol. Une fois devenu fonctionnel, ATF-6 migre dans le noyau où il se fixe à une séquence ERSE (ER stress element) présente entre autres dans le promoteur de gènes codant des chaperones.

4.4.3. IRE1 (Inositol Requiring 1)

Suite à son activation, IRE1, une protéine transmembranaire de type I à domaine tyrosine kinase, se dimérise, ce qui entraîne des transphosphorylations activatrices lui conférant plusieurs activités. Ire1 acquiert une activité d'endoribonucléase ligase responsable de l'épissage de l'ARN messager de XBP-1 (X-box binding protein 1). Ce messenger est traduit et XBP-1, un facteur de transcription, se lie alors à des promoteurs de gènes impliqués dans le transport rétrograde de protéines mal repliées du RE vers le cytosol et la dégradation de ces protéines. XBP-1 peut aussi se dimériser avec NF-Y et se lier à des séquences spécifiques de promoteurs comme ERSE (ER stress element) et UPRE (unfolded protein response element).

Le facteur de transcription XBP-1 permet avec ATF4 et ATF6 de restaurer l'homéostasie du RE. Cependant, à long terme, si le stress se prolonge, la réponse UPR peut être insuffisante, et ATF4, XBP1 et ATF6 peuvent aussi conduire à la mort programmée. IRE1 peut se lier à une protéine adaptatrice, TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), une E3 ligase. Ce complexe de signalisation peut activer des kinases impliquées dans la réponse immunitaire et

inflammatoire dont Ask1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) et des kinases interagissant avec la voie NF- κ B. Ask1 conduit à l'activation de JNK (c-Jun amino-terminal kinase) qui permettra l'activation de protéines pro-apoptotiques, tel que Bim, tout en inhibant la protéine anti-apoptotique, Bcl-2. L'activation de la voie Ask1/JNK conduit ainsi à l'activation de l'apoptose via la voie apoptotique classique induite par la mitochondrie (Xu, Bailly-Maitre et al. 2005; Tabas 2010).

Il existe aussi une voie mitochondrie-indépendante qui conduit également à l'apoptose. D'autres facteurs de transcription activés en réponse au stress du RE, ATF6 et ATF4, permettent la surexpression d'une protéine pro-apoptotique, CHOP (C/EBP homologous protein), un membre de la famille C/EBP des facteurs de transcription bZIP, capable d'inhiber la transcription de *Bcl-2* en favorisant l'activation de protéines diminuant l'expression de *Bcl-2*. En effet, le promoteur du gène *chop* contient des sites de liaison pour les acteurs principaux de l'UPR. De plus, CHOP permet également la transcription et la translocation de Bim, une protéine pro-apoptotique BH3-only de la famille de Bcl-2, dans la membrane du RE (Minamino and Kitakaze 2010). Signalons cependant que CHOP a aussi été décrit plus récemment comme pouvant aussi avoir des effets anti-apoptiques (Pour revue voir (Mertani, Zhu et al. 2001; Mayerhofer and Kodym 2003).

De plus, il a été montré récemment que l'expression de CHOP était augmentée dans les lésions athéromateuses humaines, et particulièrement dans les plaques avancées (Gargalovic 2009).

5. Objectifs du mémoire

Depuis quelques années maintenant, l'équipe Athéro en URBC, se penche sur l'effet différentiel entre les OxLDL et les MoxLDL dans différents types cellulaires. Bien que de nombreux modèles d'oxydation des LDL dans le cadre de l'athérosclérose existent, le modèle d'oxydation au cuivre est beaucoup plus documenté et plus utilisé, mais aussi de plus en plus remis en question vu sa faible pertinence physiologique. C'est pourquoi on se tourne vers des modèles d'oxydation alternatifs, tels que l'oxydation des LDL avec la myéloperoxydase (MPO). On trouve en effet au niveau des lésions athéromateuses et de la MPO et des LDL porteuses de modifications oxydatives typiques de l'action de cette enzyme.

De plus, de nombreux types cellulaires sont impliqués dans le développement de l'athérosclérose, dont les **macrophages**, responsables de la capture des LDL par les récepteurs « scavenger » et la formation de cellules spumeuses s'accumulant au cœur de l'athérome qui peut obstruer au fur et à mesure la lumière du vaisseau touché, les **cellules endothéliales**, mais aussi les **cellules musculaires lisses**.

Dans un premier temps, Damien Calay, au cours de sa thèse, a étudié l'effet comparatif des LDL oxydées au cuivre (OxLDL) et à la myéloperoxydase (MoxLDL) sur les macrophages murins RAW264.7 (Calay, Rousseau et al. 2010). Il a ainsi montré que les LDL modifiées induisaient un stress oxydatif, l'activation de Nrf2 et la surexpression d'un gène cible de Nrf2, *hmx-1*, avec un effet plus marqué pour les MoxLDL.

Dans un second temps, Ludmilla Caeseng-Koenig, durant son mémoire de Master (2009-2010), a initié une étude comparable, mais sur un type cellulaire différent, les cellules endothéliales EAhy926. Elle a montré dans des expériences préliminaires que les LDL modifiées induisaient un stress oxydatif avec un effet plus marqué pour les MoxLDL comme obtenu pour les macrophages mais contrairement aux macrophages, l'activation de Nrf2 et la surexpression du gène *hmx-1*, étaient plus marquées pour les OxLDL. Elle s'est ensuite focalisée sur la mise au point d'un système prototype de chambre de flux avec comme pour

objectif à plus long terme de pouvoir évaluer les effets combinés d'un « shear stress » et des LDL oxydées ou non.

Dans ce mémoire, nous avons donc poursuivi le travail de caractérisation des effets différentiels de Ox- et MoxLDL sur cellules endothéliales en culture en conditions statiques initié par Ludmilla Caessens-Koenig.

Nous avons tout d'abord confirmé les effets différentiels des OxLDL et MoxLDL dans les cellules endothéliales EAhY926 en étudiant le stress oxydatif, l'activation du facteur Nrf2 et l'induction d'un gène cible de Nrf2, *hmox-1* et en évaluant les effets sur ces réponses d'un antioxydant, le Trolox.

Etant donné que les cellules endothéliales répondent clairement de manière très différente par rapport aux macrophages, nous nous sommes interrogés dans la seconde partie du mémoire, sur les causes possibles des effets différentiels observés entre OxLDL et MoxLDL et avons tenté de proposer des mécanismes possibles à la base de ces différences.

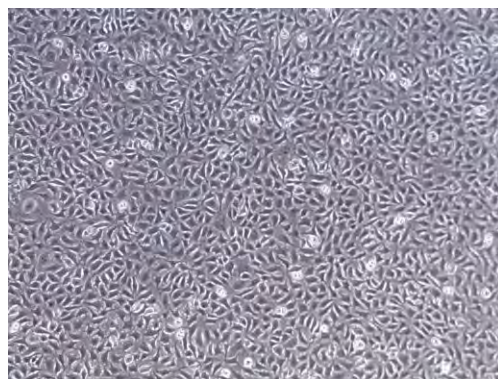


Figure III-1 : Cellules endothéliales humaines EAhy926 en culture

Tableau II-1: Matériels et réactifs nécessaires pour le repiquage des cellules EAhy926

Milieu de culture complet	Milieu DHG-L1 (Dulbecco High Glucose) + 10 % de sérum de veau foetal	Gibco, UK
Trypsine-EDTA	Trypsine (0,5 g/l) + EDTA (0,2 g/l) dans une solution de Puck	Gibco, UK
Solution de rinçage	PBS stérile (Phosphate Buffer Saline)	Lonza, Suisse
Matériels	Boîtes de culture de 75 cm ² (T75) ou de 25 cm ² (T25)	Costar, Corning, USA
	Tubes de 10 ml	Sterilin, UK
	Eppendorf Centrifuge 5702	Eppendorf, Allemagne

Tableau II-2: Matériels et réactifs nécessaires pour l'isolation des LDL

Colonnes de dessalage	Colonnes de dessalage PD-10	GE Healthcare
Milieu d'équilibration pour les LDL natives	Milieu RPMI 1640 sans glutamine	Lonza, Suisse
Milieu d'équilibration pour la production de Ox-LDL	PBS sans EDTA	Lonza, Suisse
Milieu d'équilibration pour la production de Mox-LDL	PBSox avec EDTA (1 g/l)	CHU de Charleroi, Belgique
Matériels	Tubes de 50 ml	Corning, USA
	Filtres 0,2 µm Filtropur S membrane	Sarstedt, Allemagne

II. Matériels et méthodes

1. Lignée cellulaire

1.1. Type cellulaire

Au cours de ce mémoire, les cellules EAhy926 ont été utilisées comme modèle cellulaire (figure II-1). Cette lignée hybride dérive de cellules endothéliales de veine de cordon ombilical, HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) fusionnées à des cellules épithéliales alvéolaires dérivées d'un carcinome pulmonaire de type II, les cellules A549.

1.2. Culture cellulaire

Les cellules EAhy926 sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² (T75) contenant du milieu DHG-L1 + 10 % de sérum fœtal bovin (FBS), à 37°C sous atmosphère humide de 5 % de CO₂. Les cellules sont repiquées un jour sur deux, la semaine, ou sur trois, le week-end.

1.3. Repiquage cellulaire

1.3.1. Matériels (tableau II-1)

1.3.2. Méthode

Le milieu de culture est décanté afin de permettre un double rinçage avec 7 ml de PBS préchauffé préalablement afin d'éliminer toute trace de sérum de la boîte T75. Les cellules adhérant à la surface de la boîte sont ensuite détachées par incubation avec 1 ml de trypsine-EDTA durant 3 minutes à 37°C. L'inhibition de la trypsine se fait par l'ajout de 9 ml de DHG-L1 + 10 % FBS. La suspension cellulaire est ensuite transférée dans un tube et centrifugée 5 minutes à 1000 rpm afin de récupérer le culot de cellules. Après centrifugation, le surnageant est décanté et le culot resuspendu dans 10 ml de milieu DHG-L1 + 10 % FBS. La suspension cellulaire est finalement fractionnée en 2 ou 3 volumes suivant le repiquage et la confluence requise au moment de la récolte des cellules, dans de nouvelles boîtes T75. Le volume est finalement porté à 15 ou 20 ml avec du milieu DHG-L1 + 10 % FBS suivant le jour de repiquage. Les T75 sont ensuite replacées à l'étuve sous atmosphère humide.

2. Lipoprotéines

2.1. Isolation

Les lipoprotéines de faible densité (ou LDL) sont fournies par le Centre Hospitalier Universitaire de Charleroi. Les LDL sont obtenues par ultracentrifugations séquentielles de plasmas de donneurs humains sains et ensuite stockées à 4°C sous hélium dans l'obscurité (Boudjeltia, Legssyer et al, 2006). Un dessalage des LDL est requis avant l'équilibration dans du milieu de culture ainsi qu'avant les modifications chimiques ou enzymatiques encourues par les LDL. Les cellules EAhy926 seront stimulées avec ces LDL modifiées (Ox- ou MoxLDL) ou non (NatLDL).

2.1.1. Matériels et réactifs (tableau II-2)

2.1.2. Méthode

Les colonnes PD-10 sont équilibrées pour les LDL natives, les Ox et MoxLDL respectivement avec 25 ml de milieu RPMI sans glutamine, 25 ml de PBS sans EDTA et 25

Tableau II-3: Réactifs nécessaires pour l'oxydation des LDL

Ox-LDL (CuSO ₄) :		
- Réactif Oxydant	Solution de CuSO ₄ 10 mM	UCB, Belgique
- Solution STOP	BHT (butylated hydroxytoluene ou 2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4 - méthylphénol)	Sigma, UK
Mox-LDL (MPO)	- Myéloperoxydase recombinante humaine (MPO) - H ₂ O ₂ - HCl - PBSox	CHU Charleroi, Belgique

Tableau II-4: Matériel et réactifs nécessaires pour le dosage des LDL par la méthode de Folin-Ciocalteu

Solution de Réactif A	NaOH 0,1 M, Na ₂ CO ₃ 2 %	Merck, Allemagne
Solution de Réactif B	50 ml de Réactif A + 500 µl de solution de tartrate de sodium 2 % + 500 µl de solution de CuSO ₄ 1 %	
Solutions	Solution de NaCl 0,9 %	Merck, Allemagne
	Solution de tartrate de sodium 2 %	
	Solution de CuSO ₄ 1 %	UCB, Belgique
	Réactif de Folin-Ciocalteu dilué 2x dans du NaCl 0,9 %	Merck, Allemagne
Etalon	Ovalbumine 1 mg / ml	
Matériel	Tubes pour spectrophotomètre	Kartels, Italie

ml de PBSox. 2,5 ml de LDL sont déposés au sommet de chaque colonne et, après avoir pénétrées dans la colonne, celles-ci sont récoltées suite à une élution avec 3,5 ml de milieu RPMI pour les LDL natives, 3,5 ml de PBS pour la solution pour la génération de OxLDL ou 3,5 ml de PBSox pour la solution pour les MoxLDL. Après modifications, les LDL seront finalement avec du milieu RPMI. Les solutions de LDL sont ensuite stérilisées par filtration, dosées par la méthode de Lowry et stockées à 4°C à l'obscurité.

2.2. Modification des LDL au sulfate de cuivre (OxLDL)

2.2.1. Réactifs (tableau II-3)

2.2.2. Méthode

Les LDL équilibrées dans du PBS sont incubées avec du CuSO_4 10 μM pendant 24 heures dans l'obscurité à 37°C. La réaction d'oxydation est arrêtée après 24 h par l'ajout de BHT 25 mM et mise sur glace pendant 1 heure. Les OxLDL sont ensuite dialysées sur les colonnes PD-10 équilibrées avec du RPMI et filtrées avec un filtre 0.2 μm avant le dosage par la méthode de Lowry.

2.3. Modification des LDL à la myéloperoxydase (MPO) (MoxLDL)

2.3.1. Réactifs (tableau II-3)

2.3.2. Méthode

Après un dosage des LDL équilibrées dans le PBSox par la méthode de Lowry, les LDL sont incubées avec du HCl 4 mM, 2,6 U MPO/mg de LDL, H_2O_2 1 mM pendant 5 minutes à 37°C (tableau II-3). La réaction d'oxydation est arrêtée par immersion pendant 1 minute dans la glace. Les Mox-LDL sont ensuite dialysées sur les colonnes PD-10 équilibrées avec du RPMI et filtrées avec un filtre 0.2 μm avant le dosage par la méthode de Lowry.

2.4. Dosage des LDL par la méthode de Lowry

2.4.1. Matériels et réactifs (tableau II-4)

2.4.2. Méthode

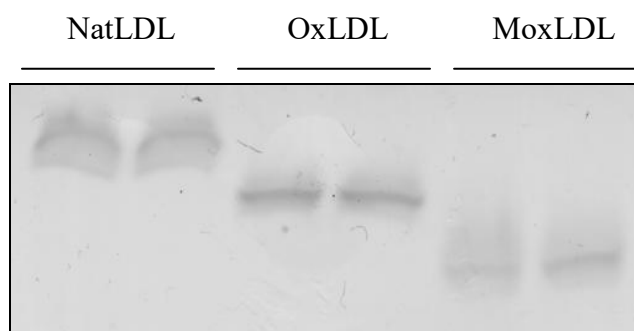
Une courbe d'étalonnage est réalisée avec de l'ovalbumine à 1 mg/ml dont le volume est ajusté à 100 μl à l'aide de PBSox, ce dernier servant de blanc. Les échantillons sont dilués 5X à raison de 20 μl LDL + 80 μl PBSox. Un volume de 400 μl de NaCl est ajouté à chaque échantillon pour obtenir un volume final de 500 μl . 2,5 ml de réactif B sont ajoutés par tube et incubés durant 10 minutes à température ambiante. Un ajout de 250 μl de réactif de Folin est finalement réalisé suivi d'une incubation de 30 minutes dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de chaque échantillon sera lue au spectrophotomètre à 750 nm.

2.5. Stimulation des cellules EAhy926 par les LDL

Au cours du mémoire, les cellules EAhy926 sontensemencées à raison de 32,000 cellules/ cm^2 et cultivées pendant 48 heures. Elles sont ensuite stimulées en présence de 100 μg de LDL/ml de milieu pour les LDL natives, les Ox- et MoxLDL. Chaque stimulation est

Tableau II-5: Réactifs nécessaires pour la migration des LDL sur gel d'agarose

TBE 10x (1 l)	- 108 g de Tris - 55 g d'acide borique - 9,3 g de Titriplex III-EDTA disodique	- Merck, Allemagne - Merck, Allemagne - Invitrogen, UK
Bleu de Charge 5x (50 ml)	- 10 ml Tris 2 M pH 6.8 - 12,5 ml de β -mercaptoéthanol - 25 ml de glycérol - 50 mg de bleu de bromophénol	- Merck, Allemagne - FlukaChemi AG, Suisse - Merck, Allemagne - Janssens Chemicals
Bleu de Coomassie (200 ml)	- 100 ml d'eau milli-Q - 80 ml de méthanol - 20 ml acide acétique - 0,3 g de bleu de Coomassie	- Accros Organics, USA
Solution de décoloration (1 l)	- 500 ml d'eau milli-Q - 400 ml de méthanol - 100 ml d'acide acétique	- Accros Organics, USA
Gel d'agarose 0,8 %	- 0,8 g agarose - 100 ml tampon TBE 1X	- Invitrogen, USA

**Figure II-2:** Les LDL modifiées au sulfate de cuivre et à la myeloperoxydase possèdent une mobilité électrophorétique différente des LDL natives. Les LDL modifiées migrent de manière différente, c'est-à-dire plus loin, sur le gel d'agarose. Dans chaque puits ont été déposés 25 μ g de LDL.**Tableau II-6:** Matériel et réactifs nécessaires pour la mesure de ROS intracellulaires

Matériel cellulaire	Cellules repiquées en plaque 24 puits (70,000 cellules par puits)	Costar, Corning, USA
Sonde fluorescente (50X)	H ₂ DCF-DA (2',7'-Dichloro-dihydro fluorescein diacetate)	Invitrogen, USA
Fluorimètre	Fluoroskan Ascent fluorimeter	Thermo Scientific, Waltham, USA
Matériel	Plaques 24 puits blanches	Greiner BioOne, Allemagne

précédée d'une mise au repos d'une heure en présence de milieu DHG-L1 seul ou de DHG-L1 + 1 % FBS, contenant ou non des inhibiteurs ou antioxydants.

2.6. Migration des LDL sur gel d'agarose

2.6.1. Principe

Le processus d'oxydation induit des modifications des résidus lysines de l'ApoB100 des LDL, chargées négativement. De cette façon, les LDL modifiées présentent une migration électrophorétique différente de celle des LDL natives, migrant plus loin dans le gel.

2.6.2. Matériels et réactifs (tableau II-5)

2.6.3. Méthode

Un gel d'agarose 0,8 % est préparé par polymérisation pendant environ 30 minutes d'un mélange de 0,8 g d'agarose et de 100 ml de tampon TBE. Chaque échantillon est dilué dans du tampon TBE afin d'obtenir une concentration de 500 µg/ml et mélangé à du bleu de charge 5X. Les échantillons sont ensuite chargés sur le gel et migrent durant 2 heures à 100 V. Les LDL sont mises en évidence par coloration du gel via une incubation de 20 minutes dans du bleu de Coomassie. Le gel est ensuite lavé plusieurs fois dans une solution de décoloration durant toute la nuit. Le gel est finalement scanné et numérisé par le logiciel Image Master Labscan.

3. Condition statique

3.1. Mesure de la production d'Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène (ROS)

3.1.1. Principe

La sonde H₂DCF-DA (2',7'-Dichloro-dihydro fluorescein diacetate), sensible aux espèces réactives dérivées de l'oxygène, est utilisée pour cette expérience. Cette sonde est clivée par des estérases intracellulaires hydrolysant les groupements acétate, ce qui empêche leur passage en dehors de la cellule. La sonde ne devient fluorescente que lorsqu'elle se trouve oxydée.

3.1.2. Matériels et réactifs (tableau II-6)

3.1.3. Méthode

La production de ROS est mesurée par incubation des cellules EAhy926, à une densité de 80,000 cellules/puits dans une plaque 24 puits, avec la sonde H₂DCF-DA 20 µM dans du DHG-L1 + 1 % FBS durant 30 minutes à 37°C à l'obscurité. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS et stimulées ou non avec 100 µg/ml de LDL natives, OxLDL ou MoxLDL durant 30 minutes. L'oxydation intracellulaire de la sonde par les ROS est quantifiée par mesure de la fluorescence émise par le DCF à 520 nm ($\lambda_{exc} = 485$ nm). La concentration protéique est aussi estimée par la méthode de Pierce après lyse des cellules avec 100 µl de Glo Lysis Buffer. La fluorescence est alors exprimée en fluorescence relative en RFU par mg de protéine.

Tableau II-7: Matériel et réactifs nécessaires pour le dosage protéique par la méthode de Pierce

Réactif	Réactif de Pierce	Thermo Fisher Scientific, USA
Matériel cellulaire	Extraits protéiques	
Etalon	BSA (Bovine Serum Albumin) 1 mg/ml	Thermo Fisher Scientific, USA
Matériels	Plaques 96 puits transparentes	Greiner Bio-One, AUS
	Programme Microplate Manager 6	Bio-Rad, USA

Tableau II-8: Matériel et réactifs nécessaires pour la transfection des cellules EAhy926 en single Luciferase Assay

Matériel cellulaire	Cellules repiquées en plaques 24 puits (cellules/puits)	Costar, Corning, USA
Plasmide rapporteur	pARE-luciférase	
Agent transfectant	Superfect	Qiagen
Milieu favorisant la transfection	OptiMEM	Gibco BRL, UK
Solution de rinçage	PBS stérile	Lonza, Suisse
Révélation	PBS non stérile	cf. Tableau II-14
	Glo Lysis Buffer	Promega, USA
	Luciferase Assay Substrate (Bright Glo)	Promega, USA
	Luminoskan Ascent luminometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
	Plaques 96 puits blanches	Greiner Bio-One, AUS

3.2. Dosage de protéines par la méthode de Pierce

3.2.1. Matériels et réactifs (tableau II-7)

3.2.2. Méthode

Dans une plaque 96 puits, selon l'extrait à analyser et l'expérience réalisée, 2 ou 10 µl d'échantillon sont déposés. Une courbe d'étalonnage est également réalisée avec des concentrations de BSA précises (0 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 µg/µl). Le volume de chaque puits est ensuite porté à 10 µl auxquels sont ajoutés 150 µl de réactif de Pierce. La réaction se produit pendant 5 minutes à température ambiante et la mesure de la DO à 660 nm peut ensuite être réalisée.

3.3. Mesure de l'activité transactivatrice de facteurs de transcription par transfection des cellules EAhy926 avec un plasmide rapporteur

3.3.1. Principe

Afin d'étudier l'activité transactivatrice d'un facteur de transcription, en l'occurrence Nrf2, AP-1 et NFκB, on peut recourir à un système rapporteur. Les cellules sont transfectées avec un plasmide encodant une enzyme, la luciférase, dont l'activité est aisément mesurable. Le gène de la luciférase porté par le plasmide est sous le contrôle d'un promoteur authentique contenant la séquence consensus reconnue par Nrf2, AP-1 ou NFκB (motif ARE, AP-1 ou κB). Quand ce dernier est activé, il se lie à sa séquence consensus et recrute la machinerie basale de transcription qui transcrit le gène codant pour la luciférase. En présence d'ATP et de Mg^{2+} , la luciférase catalyse la formation de luciféryl-adénylate, à partir de luciférine, qui est ensuite oxydé en oxyluciférine en présence d'oxygène. L'activité de la luciférase est mesurée à l'aide d'un luminomètre qui détecte les photons libérés au cours de cette réaction. Les valeurs obtenues sont proportionnelles à l'activité de la luciférase, elle-même proportionnelle au taux de transcription, qui est lui-même proportionnel à l'activité du facteur de transcription étudié.

Un dosage de Pierce est ensuite réalisé pour la normalisation des valeurs de luminescence.

3.3.2. Matériels et réactifs (tableau II-8)

3.3.3. Méthode

Le jour précédant la transfection, les cellules EAhy926 sont repiquées en plaques 24 puits à raison de 70,000 cellules/puits dans du milieu DHG-L1 + 10 % FBS. Avant la transfection, des complexes sont formés par mélange de 1 µg de plasmide ARE-luc, AP1-luc ou κB-luc, avec 0,6 µl de Superfect dans 60 µl d'optiMEM. Après 15 minutes, 360 µl d'optiMEM + 5.9 % FBS sont ajoutés aux complexes. Les cellules sont rincées avec du PBS et 400 µl de complexes sont ensuite ajoutés par puits pour une incubation de 3 heures à 37°C. Après la transfection, les cellules sont lavées avec du PBS et mises au repos 1 heure dans du DHG-L1 + 1 % FBS. Les cellules transfectées sont ensuite stimulées avec 100 µg/ml de LDL natives, OxLDL ou MoxLDL durant 24 heures. Pour mesurer l'activité luciférase, on lyse les cellules à l'aide de 150 µl de Glo Lysis Buffer, après un rinçage des cellules avec du PBS. 100 µl du lysat sont ensuite mélangés à 100 µl de substrat de la luciférase, le Bright Glo, et transférés en plaque 96 puits blanche pour permettre une lecture rapide au luminomètre. Une partie du lysat est également utilisée pour le dosage des protéines par la méthode de Pierce pour permettre la normalisation de la luminescence exprimée en RLU par mg de protéine.

Tableau II-9: Matériel et réactifs nécessaires pour la transfection des cellules EAhy926 par les siRNA

Matériel cellulaire	Cellules repiquées en T25 (800,000 cellules/T25)	Costar, Corning, USA
siRNA targeting	SMARTpool siRNA anti-Nrf2	Upstate/Dharmacon, USA
siRNA non-targeting	SMARTpool siRNA NT	Upstate/Dharmacon, USA
Milieu de transfection	DHG-L1	
Agent transfectant	Interferin	Polyplus, Lucron Bioproducts, Belgique
Solution de Rinçage	PBS stérile	Lonza, Suisse

Tableau II-10: Matériel et réactifs nécessaires pour l'analyse de l'abondance des ARNm par RT PCR en temps réel

Extraction ARN (Trizol)	Cellules repiquées en T25 (800,000 cellules/T25)	Costar, Corning, USA
	Tri Reagent Solution	Ambion, USA
	Chloroforme RNase free (RF)	Sigma Aldrich, USA
	Isopropanol 100 % RF	Merck, Allemagne
	Ethanol 75 % RF	Merck, Allemagne
	PBS RF	Lonza, Suisse
	H ₂ O RF	
	SDS 1 %	MP Biomedicals, France
	Racloirs 24 cm	TPP, Suisse
	NanoDrop Spectrophotometer ND-100	Isogen Life Sciences, Pays-Bas
Extraction ARN (Qiacube)	Cellules repiquées en T25 (800,000 cellules/T25)	Costar, Corning, USA
	Kit RNeasy mini	Qiagen, Allemagne
	Rack Reagent RNase mini (rose)	
	Rack Reagent RNeasy mini	
	Buffer RW1	
	Buffer RPE	
	RNeasy mini spin column	
	Sample tubes RB (2 ml)	
	Rotor adaptors	
	Filter-tips 1000 µl	
	Ethanol 70 % RF	Merck, Allemagne
	1,5 ml collection tube	Sarstedt, Allemagne
	NanoDrop Spectrophotometer ND-100	Isogen Life Sciences, Pays-Bas

Transcription inverse	Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit : - oligo(dT) - Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (5X) - Protector RNase inhibitor - dNTP - Transcriptor Reverse Transcriptase - Eau RF	Roche, Suisse
Real Time RT-PCR	Master Mix SYBR Green PCR	Applied Biosystems, Hollande
	Amorces sens et antisens (voir tableau II-11)	
	Plaques 96 puits	Applied Biosystems, Hollande
	Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Hollande
	Centrifugeuse Thermo Scientific IEC Centra CL3R	Thermo Scientific, Waltham, USA
	Logiciel 7000 SDS (Sequence Detection System)	Applied Biosystems, Hollande

3.4. Invalidation de Nrf2 par RNA interférence

3.4.1. Matériels et réactifs (tableau II- 9)

3.4.2. Méthode

Les cellules EAhy926 sont repiquées à une densité de 800,000 cellules par T25 12 heures avant la transfection avec les siRNA. Le « mix » de transfection consiste en un mélange de siRNA anti-Nrf2 ou de siRNA « nontargeting » 10 nM dilué dans du milieu DHG-L1 et d'Interferin, un agent transfectant, mis à incuber 10 minutes à température ambiante. Les cellules EAhy926 sont rincées avec du PBS et ensuite transfectées avec 100 µl de complexes siRNA/Interferin durant 36 heures à 37°C. Après l'incubation, le milieu de transfection est décanté, les cellules rincées avec du PBS et le milieu est remplacé par du milieu complet DHG-L1 + 10 % FBS avant de stimuler les cellules avec les LDL natives, les Ox- ou MoxLDL, pendant 6 heures.

3.5. RT-PCR quantitative

3.5.1. Matériels et réactifs (tableau II- 10)

3.5.2. Méthode

3.5.2.1. *Extraction d'ARN totaux*

Deux techniques ont été utilisées pour l'extraction d'ARN :

(a) L'extraction au Trizol

L'extraction se fait en milieu RNase free (RF). Le matériel utilisé ainsi que la paillasse doivent être tout d'abord nettoyés avec du SDS 1 % afin d'éliminer toute trace de RNase. Le milieu des T25 contenant les cellules EAhy926 est décanté afin de procéder à un lavage des cellules au PBS RF froid. Les cellules sont ensuite incubées 5 minutes avec 300 µl de TRI Reagent Solution et raclées à l'aide de râpeaux afin de transférer le lysat dans un tube RF. Après cette étape, une congélation à -70°C est possible. L'extraction d'ARN se poursuit par l'agitation vigoureuse du lysat avec 65 µl de chloroforme. Lorsque la solution est rose, une incubation de 10 minutes à température ambiante et une centrifugation de 15 minutes à 4°C à 12.000 RCF s'en suivent afin de séparer les phases et ne récolter que la phase supérieure, transparente et contenant l'ARN, dans un nouveau microtube. L'ARN est ensuite précipité par ajout de 170 µl d'isopropanol à cette solution, incubé 10 minutes à température et centrifugé 10 minutes à 12.000 RCF à 4°C. Le surnageant est alors décanté délicatement afin de rincer le culot avec 1 ml d'éthanol 75 % RF. Les eppendorfs sont ensuite centrifugés 5 minutes à 7600 RCF à 4°C. Le surnageant est éliminé au maximum avant de sécher le culot à 37°C. Le culot est ensuite resuspendu dans 20 ou 25 µl d'eau RF selon la taille du culot et incubé 10 minutes à 55°C. L'ARN total récupéré peut alors soit être congelé à -70°C ou dosé au Nanodrop avant de réaliser la transcription inverse.

(b) L'extraction au QIAcube

L'extraction se réalise également en milieu RF à l'aide du kit « RNeasy Mini » de chez Qiagen. L'utilisation de ce kit est combinée au Qiacube qui permet une extraction automatisée de l'ARN à partir de lysats cellulaires. De cette façon, les T25 contenant les cellules EAhy926 sont décantées de leur milieu de culture et rincées avec du PBS. 350 µl de Buffer RLT du kit Qiagen sont ensuite répartis dans chaque T25 afin de lyser les cellules. Les cellules sont alors raclées et le lysat transféré dans des microtubes de 2 ml du kit Qiagen spécialement conçus pour le Qiacube. L'ARN total est ensuite isolé suivant le programme « RNeasy animal tissues and cells » du Qiacube.

Tableau II-11: Liste des gènes cibles et séquences des amorces spécifiques utilisées

Gènes	Séquences des amorces		Dilution (nM)	
	Sens	Anti-sens	Sens	Anti-sens
<i>HO-1</i>	GCA CTC AGG CAG AGG GTG ATA	CAA CTC AAA GAG CTG GAT GTT	300	300
<i>GAPDH</i>	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC	GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA	300	300
<i>Nrf2</i>	GCA AGT TTG GGA GGA GCT ATT ATC	AGT TTG GCT TCT GGA CTT GGA A	300	300
<i>CHOP</i>	GCA AGA GGT CCT GCT TTC AGA T	CTC AGT CAG CCA AGC CAG AGA	300	300

Tableau II-12: Matériel et réactifs nécessaires pour l'analyse protéique par Western blot

Extraction protéique totale	Cellules repiquées en T25 (800,000 cellules/T25)	Costar, Corning, USA
	PBS non stérile	
	Tampon de lyse «Biosource»	cf. Tableau II-13
	PIC (Protease inhibitor cocktail) - 1 tablette PIC - 2 ml H ₂ O	Roche, Allemagne
	PIB (Phosphatase inhibitor buffer) (10 ml): - 25 mM Na ₃ VO ₄ - 250 mM p-nitrophenylphosphate - 250 mM β-glycerolphosphate - 125 mM NaF	- Sigma, USA - Sigma, USA - Sigma, USA - Merck, Allemagne
	Racloirs 24 cm	TPP, Suisse
	Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf, Allemagne
Extraction nucléaire	Cellules repiquées en T25 (800,000 cellules/T25)	Costar, Corning, USA
	PBS non stérile	
	Tampon hypotonique (HB) 10X (pour 1 l): - 2,1 g NaF 50 mM - 2,42 Na ₂ MoO ₄ 10 mM - 47,5 g Hepes 200 mM - 0,37 g EDTA 1mM - pH 7,9	- Merck, Allemagne - Sigma, USA - Acros Organics, Belgique - Merck, Allemagne
	Tampon de lyse NP-40 0,5 % (pour 100 ml) : - 10 ml HB 10X - 500 µl NP-40 - 89,5 ml H ₂ O	- Sigma, USA
	Tampon RE complet : - 500 µl HB 10X - 200 µl glycérol - 300 µl H ₂ O - 40 µl PIC - 40 µl PIB	- Sigma, USA - Roche, Allemagne
	Tampon SA complet:	

	<ul style="list-style-type: none"> - 500 µl HB 10X - 200 µl glycérol - 200 µl NaCl 4M - 100 µl H₂O - 40 µl PIC - 40 µl PIB 	<ul style="list-style-type: none"> - Sigma, USA - Merck, Allemagne - Roche, Allemagne
	Roue Rotator SB2	Stuart, UK
	Racloirs 24 cm	TPP, Suisse
	Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf, Allemagne
Electrophorèse	30 µg Échantillons + 10 µl bleu de charge 5X	
	Gel séparateur	cf. Tableau II-13
	Gel concentrateur	cf. Tableau II-13
	Isobutanol	Merck, Allemagne
	Tampon d'électrophorèse	cf. Tableau II-13
	Grande cuve rouge, plaques en verres, spacers, vis de serrage, peignes, générateurs	
Transfert	Papier Whatman	Merck, Allemagne
	Membrane Millipore PVDF (PolyVinylidene Fluoride)	Immobilion, USA
	Tampon de transfert	cf. Tableau II-13
	Méthanol 100 %	Accros Organics
	H ₂ O	
	Appareil de transfert	Hoeffer Demiphor, USA
Révélation	Agent bloquant Licor	Odyssey
	Anticorps primaires anti-HO-1 (Rabbit EP1391Y) et anti- α -tubuline (T 5168 monoclonal mouse)	<ul style="list-style-type: none"> - Abcam, UK - Sigma-Aldrich, USA
	Anticorps secondaires (goat anti-rabbit IgG antibody-IR dye 800 et goat anti-mouse IgG antibody-IR dye 680)	Licor-Odyssey
	Tampon de rinçage : PBS	cf. Tableau II-14
	Tampon de rinçage : PBS + 0,1 % Tween 20	Sigma-Aldrich, USA
	Marqueur de poids moléculaire bicolore	Odyssey, Hollande
	Scanner Odyssey	Odyssey, Hollande

II. Matériels et méthodes

3.5.2.2. *Transcription inverse*

Après avoir dosé l'ARN, 5 µg d'ARN sont transférés dans un microtube et le volume total est porté à 12 µl à l'aide d'eau RF. 1 µl d'« oligo dT » est ajouté et va se fixer aux queues polyA des ARNm. Pour permettre l'hybridation des « oligo dT », une incubation de 10 minutes à 65°C est nécessaire. Durant l'incubation, un mix de 7 µl est préparé, contenant 4 µl de tampon, 0,5 d'anti-RNase, 2 µl de dNTP et 0,5 µl de reverse transcriptase. Le « mix » est ensuite incubé 30 minutes à 55°C, puis 5 minutes à 85°C pour inactiver l'enzyme et arrêter la réaction. Les échantillons peuvent alors être congelés à -20°C ou utilisés pour la RT-PCR quantitative.

3.5.2.3. *RT-PCR quantitative*

L'ADNc obtenu pour chaque condition lors de la rétro-transcription est dilué 100X dans de l'eau MilliQ (2 µl ADNc + 198 µl d'eau milliQ) et un « mix » PCR spécifique pour chaque gène étudié contenant les amorces appropriées est préparé. Ce mélange contient 12,5 µl de SyBRgreen PCR Master Mix, 2,5 µl d'amorces sens et anti-sens préalablement diluées (tableau II-11) et 2,5 µl d'eau RF. 20 µl de ce mix sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits, auxquels sont ajoutés 5 µl d'ADNc dilué 100X. Une fois les puits remplis, la plaque est recouverte d'un film plastique autocollant et centrifugée 1 minute à 600 rpm. Après centrifugation, la plaque est placée dans l'Abiprism 7300HT qui effectuera quarante cycles d'amplification et mesurera la fluorescence associée à chacun des puits à chacun de ceux-ci. La RT-PCR se déroule selon les modalités suivantes : après 2 min à 50°C, une dénaturation de 10 min est effectuée à 95°C avant de réaliser 40 cycles constitués chacun de 15 secondes de dénaturation à 95°C suivi d'une hybridation et élongation des amorces de 1 min à 60°C. Le gène de référence utilisé est la *GAPDH*.

3.5.2.4. *Analyse des résultats*

La méthode utilisée pour l'analyse des résultats est la méthode des $\delta\delta Ct$. Ainsi, après avoir déterminé les Ct (ou cycles seuils), cycles auxquels l'intensité de la fluorescence est significativement plus élevée que celle du bruit de fond, le ΔCt est calculé. Dans cette étape, les Ct obtenus pour chaque gène sont normalisés par les valeurs Ct obtenues pour le gène de référence *GAPDH*. Le $\delta\delta Ct$ est ensuite calculé où le δCt de la condition contrôle est soustrait du δCt de chaque condition. Après cette normalisation, le « fold » d'induction, correspondant à l'expression relative d'un gène dans une condition test par rapport à la condition contrôle, est calculé grâce à la formule $2^{-\delta\delta Ct}$.

3.6. Western blot

3.6.1. Matériels et réactifs (tableaux II-12/13)

3.6.2. Méthode

3.6.2.1. *Extraction protéique totale*

Les extraits protéiques totaux sont préparés à partir des cellules EAhy926 cultivées et stimulées avec 100 µg/ml de LDL dans des T25, repiquées à raison de 800,000 cellules par T25. Après incubation, les cellules sont rincées 2X avec du PBS froid avant d'être lysées et raclées avec 100 µl de tampon de lyse Biosource complémenté de 40 µl de PIC (Protease Inhibitor Cocktail) et de 40 µl de PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer) par ml. Le lysat cellulaire est entièrement récupéré et mis dans une série de microtubes. Les microtubes sont alors centrifugés pendant 10 min, à 13.000 rpm, à 4°C afin de faire sédimenter les débris

Tableau II-13: Composition des réactifs et solutions utilisés lors du Western Blot

Tampon de lyse Biosource (100 ml) complet	<ul style="list-style-type: none"> - TRIS 10 mM pH 7,4 (0,131 g) - NaCl 100 mM (0,58 g) - Glycérol 10 % (10 ml) - NP-40 1 % (1 ml) - SDS 0,1 % (0,1 g) - DOC (déoxylate) 0,5 % (0,5 g) - 40 µl PIC - 40 µl PIB 	<ul style="list-style-type: none"> - Merck , Allemagne - Merck , Allemagne - Sigma, USA - Sigma, USA - MP Biomedicals, USA - Roche, Allemagne
Gel séparateur 12 % (10%)	<ul style="list-style-type: none"> - 8,4 ml (8,4 ml) Tris-HCl 1,5 M pH 8.8 - 14 ml (11,6 ml) Acryl/Bis - 12,6 ml (15 ml) H₂O - 175 µl APS 25 % - 10,5 µl TEMED (tetra-méthyl-éthylènediamine) 	<ul style="list-style-type: none"> - Bio-Rad , USA - GE Healthcare, UK - GE Healthcare, UK
Gel concentrateur	<ul style="list-style-type: none"> - 2,5 ml Tris-HCl 1,5 M pH 6.8 - 1,7 ml Acryl/Bis - 5,8 ml Eau - 50 µl APS 25 % - 3 µl TEMED 	<ul style="list-style-type: none"> - Bio-Rad , USA - GE Healthcare, UK - GE Healthcare, UK
Tris-HCl 1,5 M pH 8.8 SDS 0,4 %	<ul style="list-style-type: none"> - Tris : 10,9 g / 100 ml - SDS : 0,4 g / 100 ml 	<ul style="list-style-type: none"> - Merck, Allemagne - MP Biomedicals, USA
Tris-HCl 1,5 M pH 6.8 SDS 0,4 %	<ul style="list-style-type: none"> - Tris : 6,05 g / 100 ml - SDS : 0,4 g / 100 ml 	<ul style="list-style-type: none"> - Merck, Allemagne - MP Biomedicals, USA
Tampon d'électrophorèse	<ul style="list-style-type: none"> - Tris-HCl 25 mM (30,28 g / l) - Glycine 192 mM (23 g / l) - SDS 0,1 % (10 g / l) - pH 8,3 - 8,5 	<ul style="list-style-type: none"> - Merck, Allemagne - Merck, Allemagne - MP Biomedicals, USA
Tampon de transfert	<ul style="list-style-type: none"> - Tris : 4,8 g / l - Glycine : 23 g/l - Méthanol : 200 ml/l 	<ul style="list-style-type: none"> - Merck, Allemagne - Merck, Allemagne - Merck, Allemagne
PBS (+ Tween 0,1 %)	<ul style="list-style-type: none"> - Tampon Phosphate 10 mM (20 ml/l) - NaCl : 150 mM (9 g/l) - H₂O (- Tween 20 : 1 ml/l) 	<ul style="list-style-type: none"> - Merck, Allemagne - Sigma-Aldrich, USA
Bleu de charge	<ul style="list-style-type: none"> - 10 ml Tris-HCl 0,5 M pH 8 - 10 ml SDS 20 % - 5 ml β-Mercaptoéthanol - 10 ml Glycérol - 17,5 g Bleu de bromophénol 	<ul style="list-style-type: none"> - MP Biomedicals, USA - FlukaChemi AG, Suisse - MP Biomedicals, USA - Jansens Chemicals

cellulaires. Le surnageant est récupéré et une fraction de celui-ci est utilisée pour le dosage de la concentration protéique par la méthode de Pierce. Les échantillons sont stockés à -70°C.

3.6.2.2. *Extraction Nucléaire*

Les extraits nucléaires sont préparés à partir des cellules EAhy926 cultivées et stimulées avec 100 µg/ml de LDL dans des T25, repiquées à raison de 800,000 cellules par T25. Après incubation, les cellules sont rincées 1X avec du PBS froid et 1X au PBS froid additionné de 1 mM Na₂MoO₄ et 5 mM NaF. Avant d'être lysées et raclées avec 100 µl de tampon de lyse 0,5 % NP-40, les cellules sont incubées 5 minutes sur glace en présence de HB 1x. Le lysat cellulaire est entièrement récupéré dans une série de microtubes et centrifugé pendant 30 secondes, à 13000 rpm. Le surnageant, constituant les protéines cytoplasmiques, est récupéré et tandis que le culot est resuspendu dans 20 µl de RE et 30 µl de SA, tous deux complétés de PIC et de PIB. Les échantillons sont ensuite placés sur roue à 4°C durant minimum 30 minutes et ensuite centrifugés 10 minutes à 13.000 rpm à 4°C. Les surnageants sont alors récupérés et une fraction de ceux-ci est utilisée pour le dosage de la concentration protéique par la méthode de Pierce. Les échantillons sont stockés à -70°C.

3.6.2.3. *Western blot*

Une fois le système de plaques, spacers, supports montés afin de former un montage étanche, le gel séparateur est coulé entre les plaques jusqu'à environ 1 cm en dessous du peigne. De l'isobutanol est ensuite placé au-dessus du mélange afin d'empêcher tout contact avec l'air. Après 1 heure de polymérisation, l'isobutanol est éliminé et le gel rincé abondamment à l'eau distillée avant de couler le gel concentrateur. Dès le coulage, les peignes sont placés verticalement entre les deux plaques afin de former les puits. Après une seconde polymérisation de 30 minutes, le peigne est enlevé afin de faire apparaître les puits et les échantillons sont chargés. Chaque échantillon (30 µg de protéines dans un volume final de 50 µl) est additionné de 10 µl de bleu de charge 5X avant d'être placé 5 minutes à 100°C et brièvement centrifugé. Les surnageants sont déposés dans chaque puits ainsi qu'un étalon de poids moléculaire fluorescent.

Une fois le chargement terminé, les plaques et le support sont plongés dans la cuve d'électrophorèse contenant le tampon d'électrophorèse. La cuve est ensuite complètement remplie de tampon et le couvercle placé afin de connecter la cuve à un générateur pour permettre la migration. Le gel est donc soumis à un ampérage de 35 mA pendant 30 minutes et ensuite 45 mA pendant environ 2 heures 30 minutes. Lorsque le front de migration, visible grâce au bleu de charge, atteint le fond du gel, le courant est coupé et le gel sorti de la cuve. Après démoulage et découpage de la membrane et des papiers Whatman de la taille du gel, le gel est placé dans un système en sandwich sur l'appareil de transfert. Préalablement, la membrane PVDF a été incubée 1 minute dans du méthanol et 10 minutes dans du tampon de transfert. Après avoir placé la membrane sur le gel ainsi que deux papiers Whatman et une éponge imbibés de tampons de transfert, le montage est retourné et 2 autres papiers Whatman imbibés de tampon de transfert sont posés ainsi qu'une seconde éponge humide. Autour du montage, dans l'appareil de transfert, est aussi placé un film transparent afin de focaliser le courant sur la membrane. Après avoir mis le couvercle, l'appareil est branché au générateur et le transfert des protéines sur la membrane s'opère durant 2 heures à un ampérage de 150 mA. Après le transfert, la membrane est bloquée avec de l'agent bloquant Licor diluée dans du PBS sans Tween toute la nuit à 4°C. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire dilué dans la solution Licor avec du Tween 0,1 % 20 pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est ensuite lavée 4 x 5 minutes avec du PBS Tween 0,1 % avant d'être incubée 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire. La membrane est ensuite lavée 4X 5 minutes avec du PBS Tween 0,1 % et 2X 5 minutes avec du PBS sans

Tableau II-14: Composition des autres solutions et réactifs

Trolox 500 μ M (60 μ l de la solution stock 250 mM dilués dans 30 ml de DHG-L1)	- 62,57 mg de Trolox - 1 ml d'éthanol stérile = 250 mM	- Sigma-Aldrich, USA - Merck, Allemagne
SIN-1	- 1 fiole de 1 mg de SIN-1 - 485 μ l de HBSS complet stérile	- Invitrogen Molecular Probes
HBSS	- 0,137 M NaCl - 5,36 mM KCl - 440 nM KH_2PO_4 - 5 mM glucose - 299 nM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 4,2 mM NaHCO_3	- Merck, Allemagne - Merck, Allemagne - Merck, Allemagne - Merck, Allemagne - Merck, Allemagne - Merck, Allemagne
HBSS complet	- HBSS - 0,16 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,24 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7,35	- Merck, Allemagne - Merck, Allemagne
Inhibiteur de la machinerie de transcription	Actinomycine D (1 μ g/ml)	Calbiochem, USA
Inhibiteur de p38	SB203580, 10 μ M (stock : 10 mM)	Enzo Life Sciences, Suisse
Inhibiteur de ERK 1/2	PD98059, 20 μ M (stock : 40 mM)	Enzo Life Sciences, Suisse
Inhibiteur MEK 1/2	U0126, 10 μ M (stock : 10 mM)	Cell Signaling, USA
Inhibiteurs PKC	- Calphostin C, 200 nM (stock : 2 mM) - RO318220, 1 μ M (stock : 50 mM) - Rottlerin 10 μ M	- Enzo Life Sciences, Suisse - Calbiochem, USA - Calbiochem, USA
Inhibiteurs CK2	- Apigenin, 20 μ M - DRB, 50 μ M (stock : 50 mM) - TBB (Casein Kinase II inhibitor I), 20 μ M	- Sigma-Aldrich, USA - Enzo Life Sciences, Suisse - Calbiochem, USA

Tween avant d'être séchée 1 heure à 37°C à l'abri de la lumière. La membrane est finalement placée dans le scanner Odyssey pour permettre la visualisation des bandes fluorescentes et une quantification est alors possible à l'aide du programme Odyssey.

3.7. Autres Réactifs (tableau II-14)

Un antioxydant est utilisé tout au cours de ce mémoire, le Trolox (6-Hydroxy-2, 5,7, 8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid). Cet analogue de la vitamine E est utilisé à une concentration de 500 μ M.

Dans de nombreuses expériences, un contrôle positif a également été utilisé, le SIN-1 (3-morpholinosydnonimine hydrochloride), un donneur de peroxynitrite.

Un inhibiteur de la machinerie de transcription, l'actinomycine D a également été utilisé afin d'étudier la stabilité d'un messenger, *ho-1*.

Des inhibiteurs de kinases dont des inhibiteurs de PKC, PKC δ , ERK 1/ 2, MEK 1/ 2, p38, PI3K et de CK2 ont été utilisés afin de voir l'implication des kinases dans la voie Nrf2.

3.8. Tests statistiques

Les différents tests statistiques (test t de student) ont été réalisés via le logiciel SigmaStat.

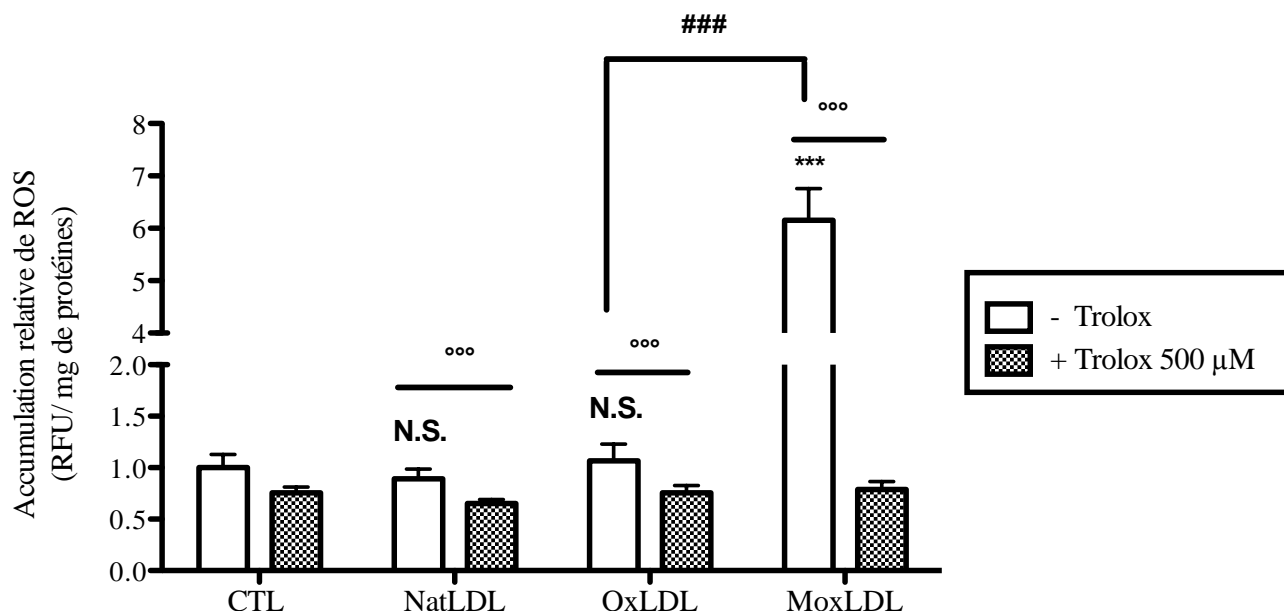


Figure III-1: Génération d'un stress oxydatif en présence de LDL modifiées. L'accumulation relative de ROS a été évaluée grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente $H_2DCF-DA$. La mesure de la fluorescence émise a été normalisée par la quantité de protéines mesurée par un dosage protéique par la méthode de Pierce. Les cellules EAhy926 ont été stimulées 30 minutes avec 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées avec ou sans Trolox 500 µM après avoir été incubées 30 minutes en présence de la sonde. Les résultats sont exprimés de manière relative aux cellules contrôles arbitrairement fixées à 1 et en tant que moyennes \pm SEM (n=3). *** = différence statistiquement significative ($p < 0.001$) par rapport au CTL. °°° = différence statistiquement significative ($p < 0.00$) par rapport aux conditions sans Trolox. ### = différence statistiquement significative ($p < 0.001$) par rapport aux MoxLDL.

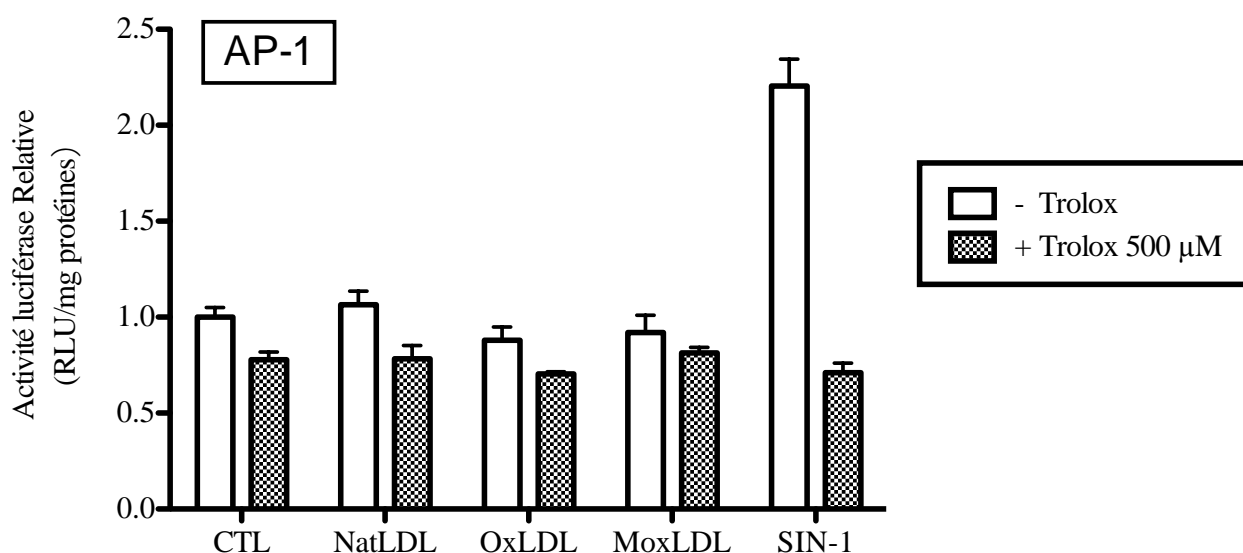


Figure III-2: Mesure de l'activité transactivatrice d'AP-1 en réponse à une stimulation avec des LDL natives ou modifiées. Cette mesure s'opère après 24 heures de stimulation avec des LDL natives ou oxydées (100 µg/ml) et avec du SIN-1 (1mM), servant de contrôle positif, avec ou sans Trolox (500 µM). Un système rapporteur en Single Luciferase a été utilisé (pAP1-luc). Ces résultats sont exprimés de manière relative par rapport aux cellules contrôles arbitrairement fixées à 1.

III. Résultats

Etude de la réponse des cellules endothéliales EAhy926 suite à une stimulation avec des LDL

Les résultats générés lors de ce mémoire constituent une suite aux recherches de Ludmilla Caesens-Koenig effectuées durant son mémoire (2009-2010) sur les cellules endothéliales EAhy926. Auparavant, l'effet des LDL natives ou modifiées avait été évalué sur macrophages murins RAW 264.7 (Thèse de Damien Calay ; Calay et al. 2010). Pour oxyder les LDL, nous utilisons soit des sels de Cu^{2+} , ce qui altère la fraction lipidique et la fraction protéique des LDL (OxLDL) ou de la myéloperoxydase recombinante en présence de H_2O_2 , ce qui ne modifie que l'ApoB100. Les recherches préliminaires effectuées sur cellules endothéliales ont permis de caractériser un modèle dans lequel les LDL modifiées, faiblement cytotoxiques, génèrent un stress oxydatif intracellulaire et induisent l'activation de la voie Nrf2, mais avec des différences marquées par rapport aux macrophages murins. Dans ce mémoire, le but était de valider les résultats déjà obtenus sur cellules endothéliales, d'étudier les voies de signalisation activées par le stress oxydatif généré par les LDL modifiées et de décortiquer les mécanismes d'activation de la voie Nrf2 par les LDL modifiées afin de mieux comprendre son rôle et son mode d'action au sein des cellules endothéliales.

1. Caractérisation de la génération d'un stress oxydatif intracellulaire dans les cellules EAhy926 stimulées avec des LDL modifiées

Le stress oxydatif est associé à l'athérosclérose et joue un rôle important dans le développement de cette pathologie. Les LDL modifiées sont connues pour engendrer un stress oxydatif intracellulaire, responsable de l'activation de nombreuses voies de signalisation. Afin d'évaluer si la stimulation des cellules EAhy926 avec les LDL natives ou modifiées induit un stress oxydatif, une mesure de la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) a été réalisée après 30 minutes de stimulation grâce à l'usage de la sonde fluorescente $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. Comme le montre la Figure III-1, lorsque les cellules sont incubées en présence de 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives (NatLDL) ou oxydées au cuivre (OxLDL), aucune production significative de ROS n'est observée par rapport à la condition contrôle. Cependant, lorsque les cellules EAhy926 sont stimulées avec les LDL oxydées à la myéloperoxydase (MoxLDL), la production de ROS est augmentée de 6 fois par rapport au contrôle. En résumé, parmi ces trois conditions, seules les MoxLDL sont capables de générer un stress oxydatif avec une production de ROS élevée dans les cellules endothéliales EAhy926. Les LDL, modifiées ou non, ne semblent pas perturber la morphologie des cellules endothéliales (Figure II-1).

L'effet du Trolox, un antioxydant hydrophile analogue à la vitamine E, a été évalué à une concentration de 500 μM sur cette production de ROS induite par les MoxLDL. En présence de Trolox, une diminution significative de l'accumulation de ROS est observée pour toutes les conditions par rapport aux conditions sans Trolox. Plus particulièrement, le Trolox empêche le stress oxydatif induit par les MoxLDL dans les cellules endothéliales.

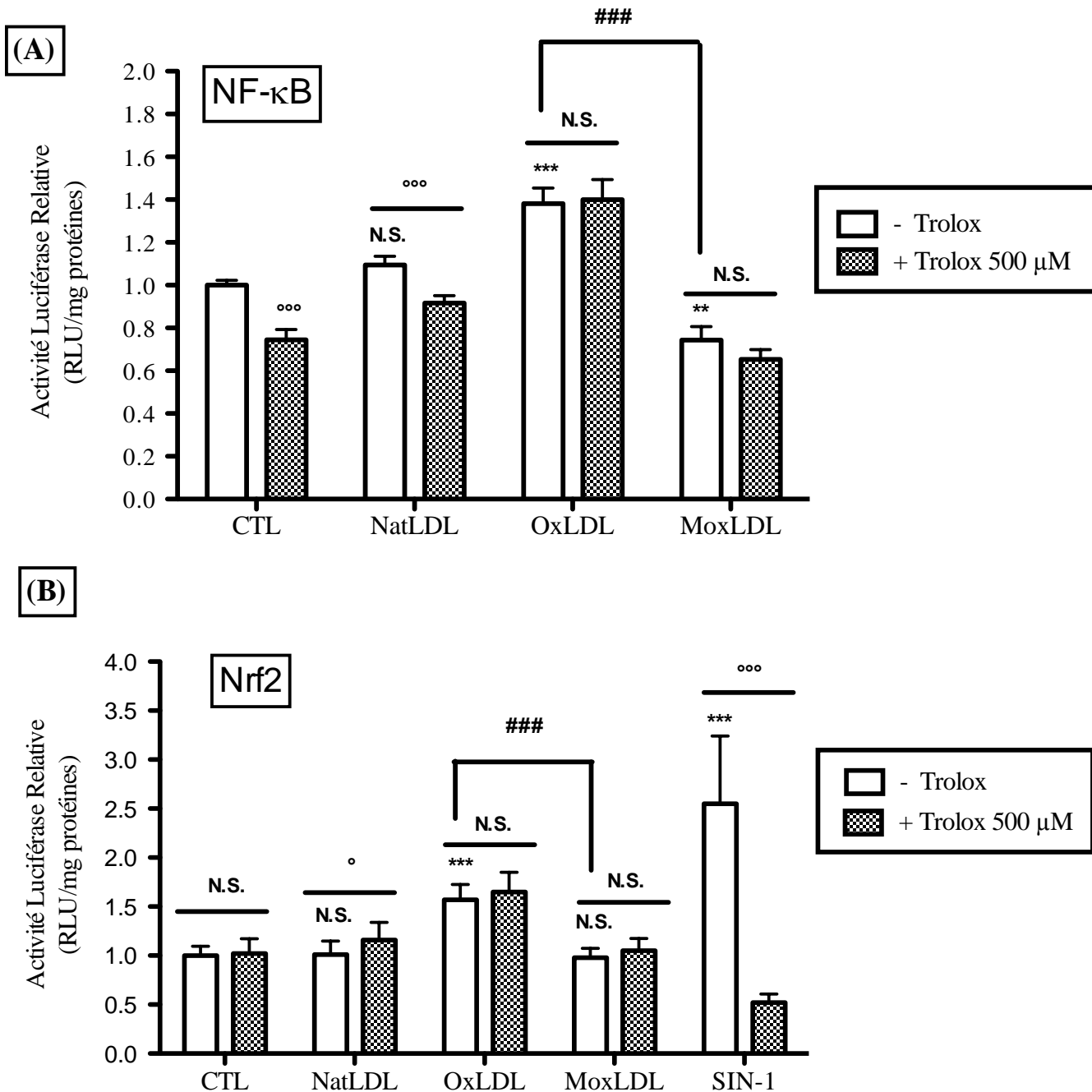


Figure III-3: Mesure de l'activité transactivatrice des facteurs de transcription NF κ B (A) et Nrf2 (B) en réponse à une stimulation avec des LDL. Cette mesure s'opère après 24 heures de stimulation avec des LDL natives ou oxydées (100 μ g/ml) et avec du SIN-1 (1mM), servant de contrôle positif, avec ou sans Trolox (500 μ M). Un système rapporteur en Single Luciferase a été utilisé avec les plamides p κ B-luc (A) et pARE-luc (B). Ces résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm SEM (n=3) et calculés de manière relative aux cellules contrôles arbitrairement fixées à 1. N.S. = différence statistiquement non significative par rapport au CTL, ou en absence de Trolox. ** et *** = différence statistiquement significative (p<0.01 et p<0.001) par rapport au CTL. °, °° et °°° = différence statistiquement significative (p<0,05, p<0.01 et p<0.00) par rapport aux conditions sans Trolox. ### = différence statistiquement significative (p<0.001) par rapport aux MoxLDL.

2. Caractérisation des voies de signalisation activées en réponse à une stimulation avec des LDL dans les cellules EAhy926

2.1. Etude de l'effet des LDL sur l'activité transactivatrice de facteurs de transcription redox-sensibles dans les cellules EAhy926

Le stress oxydatif, généré entre autres par l'incubation des cellules EAhy926 en présence de MoxLDL, permet l'activation de nombreux facteurs de transcription redox sensibles. Parmi ces facteurs de transcription, on retrouve AP-1, NFκB et Nrf2 qui jouent des rôles cruciaux dans le développement de l'athérosclérose via l'induction de gènes antioxydants, pro/anti-inflammatoires et anti-apoptotiques (cf. Introduction, Paragraphe 4.3).

2.1.1. AP-1

Afin d'évaluer si le facteur de transcription AP-1 est activé par la présence de ROS générés par les MoxLDL dans les cellules EAhy926, nous avons mesuré son activité transactivatrice suite à la stimulation avec les LDL. Nous avons transfecté les cellules EAhy926 avec un système rapporteur en luciférase simple (pAP1-luc) avant de les stimuler pendant 24 heures en présence de 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées. Comme le montre la Figure III-2, aucune condition de stimulation n'induit une augmentation de l'activité transactivatrice de AP-1 par rapport aux cellules contrôle. Cependant, une stimulation des cellules avec du SIN-1 1 mM, constituant un contrôle positif, génère bien une augmentation importante du taux de transactivation de AP-1. L'ajout de Trolox à une concentration de 500 µM empêche l'augmentation de l'activité transactivatrice de AP-1 induite par le SIN-1. Cette expérience suggère que le stress oxydatif généré par les MoxLDL dans les cellules endothéliales n'active pas le facteur de transcription AP-1.

2.1.2. NFκB

NFκB est un facteur de transcription jouant un rôle essentiel dans le développement de l'athérosclérose. Ce facteur de transcription est bien connu pour être activé par un stress oxydatif. La même procédure expérimentale a été appliquée que pour l'évaluation de l'activité transactivatrice d'AP-1. Ainsi, les cellules EAhy926 ont été transfectées avec un plasmide rapporteur simple luciférase contenant le site consensus de liaison du facteur de transcription NFκB (pκB-luc). La Figure III-3A indique que la stimulation des cellules EAhy926 avec 100 µg/ml de LDL oxydées au sulfate de cuivre induit une activité transactivatrice de NFκB supérieure à la condition contrôle, de manière très hautement significative. Cependant, la condition MoxLDL ne semble avoir aucun effet sur l'activité de NFκB. Au contraire, l'incubation des cellules en présence de MoxLDL induit une diminution significative de l'activité transactivatrice de NFκB par rapport à la condition contrôle. Aucune variation significative de l'activité transactivatrice de NFκB n'est observée dans la condition NatLDL, en accord avec les résultats obtenus sur la production de ROS. De manière inattendue, l'ajout de Trolox (500 µM) ne provoque pas de diminution significative de l'activité transactivatrice de NFκB pour les conditions LDL oxydées (Ox- et MoxLDL) contrairement aux conditions contrôles et LDL natives.

2.1.3. Nrf2

Nous nous sommes ensuite focalisés sur l'activité transactivatrice du facteur de transcription Nrf2. En effet, ce facteur est reconnu pour être activé par les stress oxydatifs modérés et il joue un rôle bénéfique important grâce à l'induction de gènes antioxydants et anti-apoptotiques permettant de restaurer l'homéostasie cellulaire. Comme dans l'étude de l'activité transactivatrice des deux facteurs de transcription précédents, nous avons évalué l'activité transactivatrice de Nrf2 dans les cellules EAhy926 via un système rapporteur en

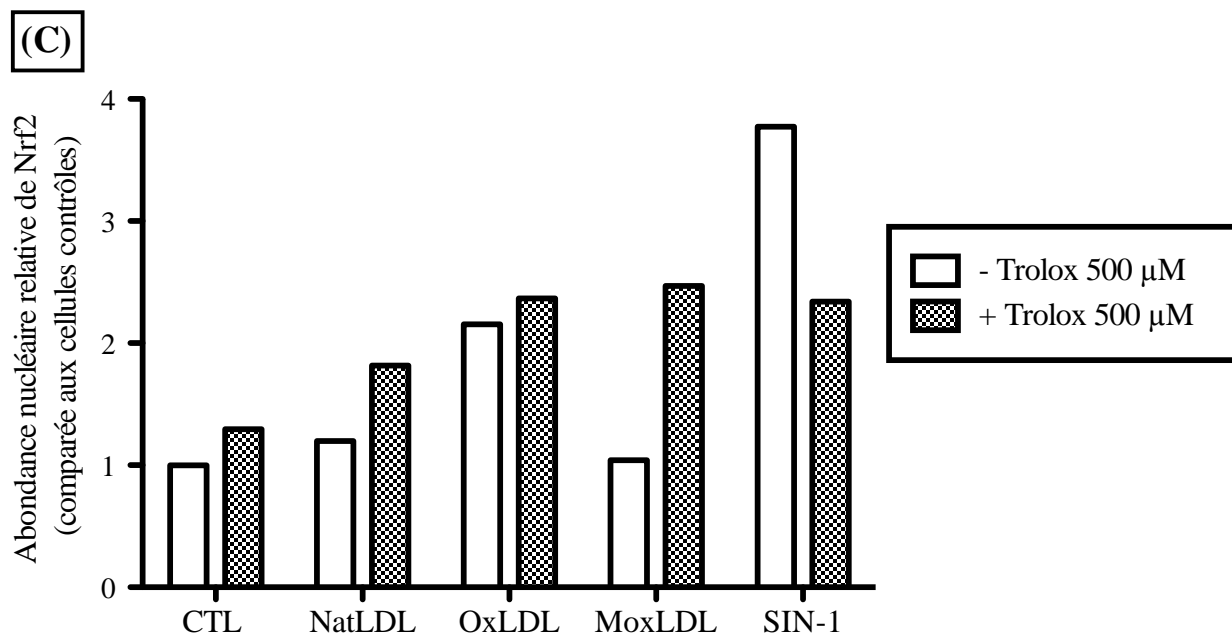
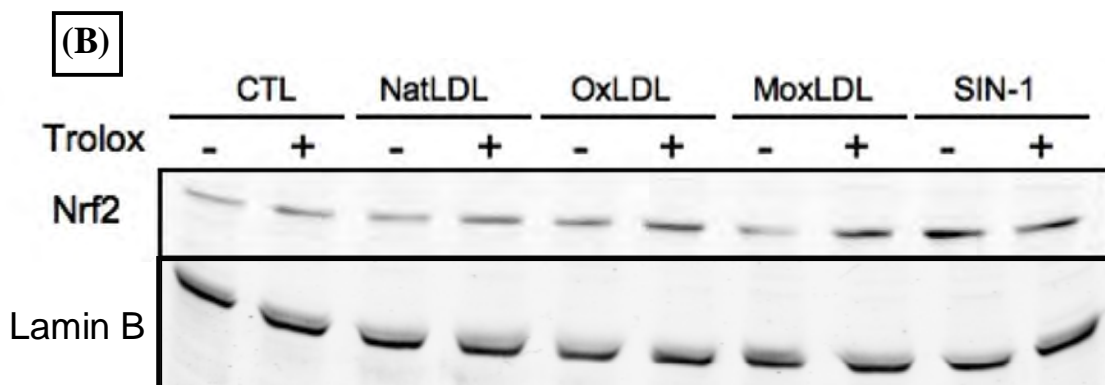
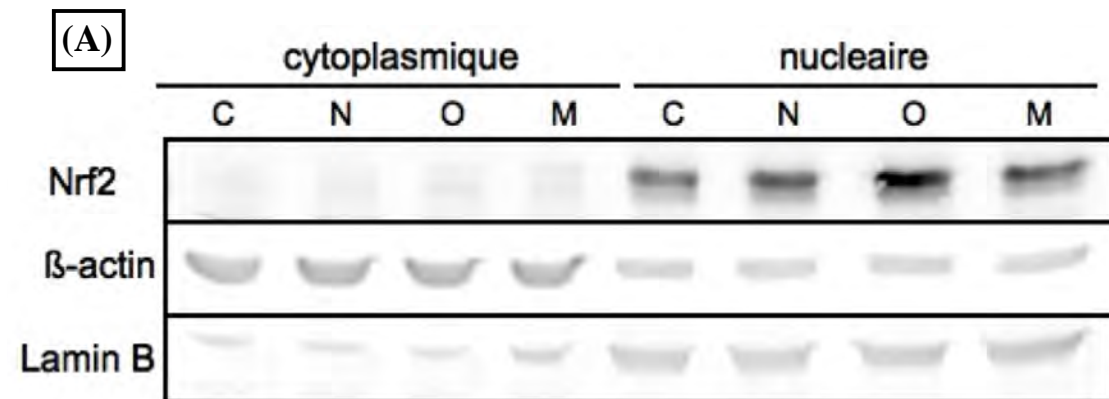


Figure III-4: Translocation nucléaire de Nrf2. (A) Les cellules EAhy926 ont été incubées 4 heures en présence de LDL natives ou modifiées (100 μ g/ml). Les extractions cytoplasmiques et nucléaires ont été réalisées selon les protocoles décrits dans la partie Matériels et Méthodes. Nrf2 est visualisable à 98 kDa. Nous avons utilisé comme contrôles de charge la β -actine (42 kDa) pour les extraits cytoplasmiques et la lamine B (67 kDa) pour les extraits nucléaires. (B) Les cellules EAhy926 ont été incubées 4 heures en présence de 100 μ g/ml de LDL natives ou modifiées avec ou sans Trolox 500 μ M. Les extractions protéiques et l'analyse en Western blot ont été réalisées selon les protocoles décrits dans la partie Matériels et Méthodes. (C) Analyse quantitative du Western blot illustré en (B).

luciférase simple. Après transfection des cellules avec le plasmide pARE-luc, les cellules endothéliales ont été stimulées pendant 24 heures en présence de 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées. Comme le montre la Figure III-3B, les LDL oxydées au sulfate de cuivre (OxLDL) induisent l'activation de Nrf2, de manière très hautement significative par rapport à la condition contrôle. Par contre, l'incubation des cellules endothéliales en présence de LDL natives ou oxydées à la MPO (MoxLDL) n'a aucun effet significatif sur l'activité de Nrf2 par rapport à la condition contrôle. Signalons que Calay et al (Calay, Rousseau et al. 2010) avaient obtenu des résultats très différents sur les macrophages murins RAW 264.7, puisque dans ce modèle et les Mox- et les OxLDL activent Nrf2, mais avec une réponse bien plus marquée pour les MoxLDL. Nous avons également voulu étudier l'implication des ROS dans l'activation de ce facteur de transcription, par utilisation du Trolox. Cependant, bien que Nrf2 soit connu pour être activé par l'accumulation de ROS, le Trolox n'a aucun effet significatif sur l'activation de Nrf2 induite par les OxLDL. Un contrôle positif, le SIN-1, a été utilisé. Ce dernier, connu pour activer la voie Nrf2 via la production de peroxy-nitrite induit une augmentation significative de l'activité de Nrf2 qui est fortement réduite par l'ajout de Trolox via son effet « scavenger » de ROS.

En résumé, sur base des résultats illustrés aux Figures III-1 à III-3, nous pouvons conclure que seule la stimulation des cellules endothéliales avec les OxLDL permet une activation plus importante du facteur de transcription Nrf2. Toutefois cette activation induite par les OxLDL ne semble pas dépendante d'un stress oxydatif. Inversement, le stress oxydatif induit par les MoxLDL ne suffit pas pour activer Nrf2.

2.2. Etude de l'effet des LDL sur la voie Nrf2

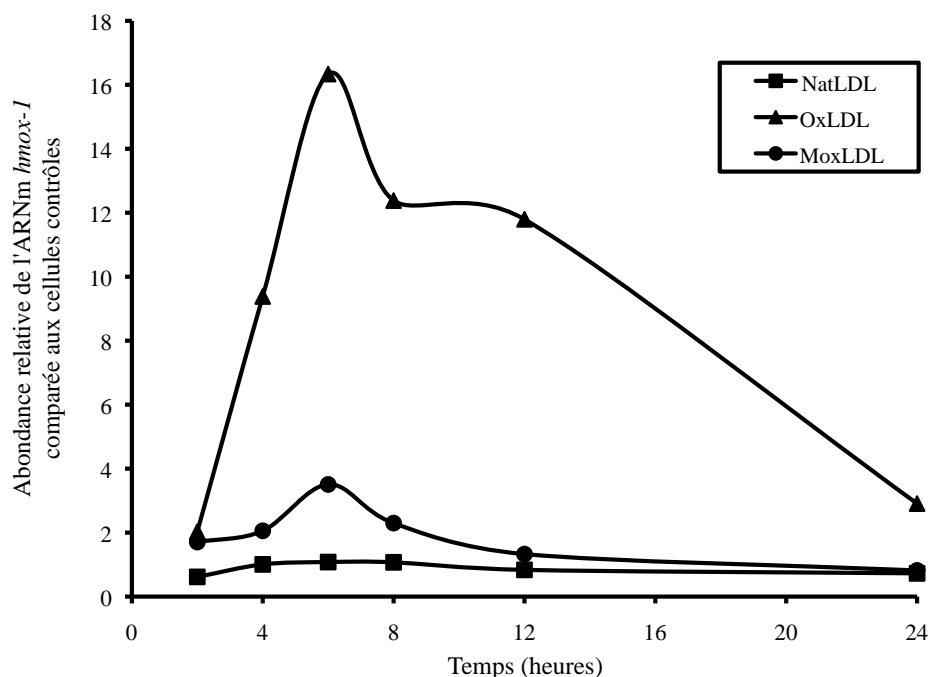
2.2.1. Etude de l'effet des LDL sur la translocation nucléaire de Nrf2

Afin de confirmer que l'activité de Nrf2 est augmentée suite à une stimulation avec les LDL oxydées au sulfate de cuivre, nous avons évalué la translocation nucléaire de Nrf2 par Western Blot. En effet, pour être activé, Nrf2 doit être libéré de son inhibiteur, KEAP-1, via un changement de conformation de ce dernier, permettant à Nrf2 de migrer du cytoplasme dans le noyau, de se dimériser avec la petite protéine Maf et de se lier aux séquences ARE.

Après 4 heures de stimulation des cellules EAhy926 en présence de 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées, une extraction nucléaire a été réalisée afin de récupérer les fractions cytoplasmiques et nucléaires, analysées par Western Blot. Deux contrôles de charge, la β -actine et la lamine B, situées respectivement à 42 kDa et 67 kDa, ont été réalisés. Comme le montre la Figure III-4A, nous pouvons observer une bande à 98 kDa dans les extraits nucléaires correspondant à la protéine Nrf2. Aucune bande n'est visible pour les extraits cytoplasmiques, ce qui est attendu en l'absence d'activation du facteur de transcription Nrf2, puisque dans ces conditions il est ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. Cependant, pour les extraits nucléaires, bien que Nrf2 soit observé dans toutes les conditions, seule l'incubation avec les OxLDL induit une augmentation de l'abondance nucléaire de Nrf2. En résumé, ces résultats montrent que le facteur de transcription Nrf2 est transloqué dans le noyau suite à une stimulation des cellules endothéliales avec des OxLDL, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus à la Figure III-3B.

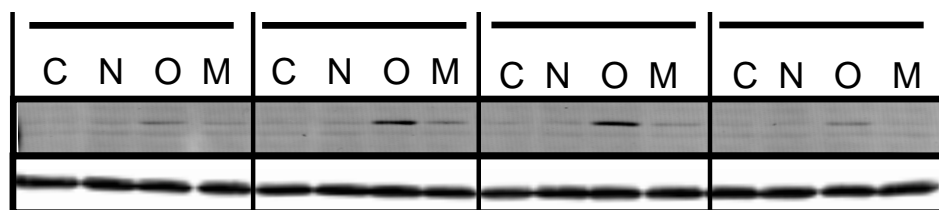
Afin de vérifier si la translocation nucléaire de Nrf2 induite par les OxLDL est comme pour l'expérience de transactivation ROS-indépendante, une extraction de protéines nucléaires a été réalisée sur des cellules EAhy926 après 4 heures de stimulation avec 100 µg/ml de LDL natives ou oxydées en présence ou non de Trolox (500 µM) (Figure III-4B). Une augmentation de l'abondance nucléaire de Nrf2 est observée suite à la stimulation des

(A)



(B)

HO-1 (33kDa)
! -tubuline (55 kDa)



(C)

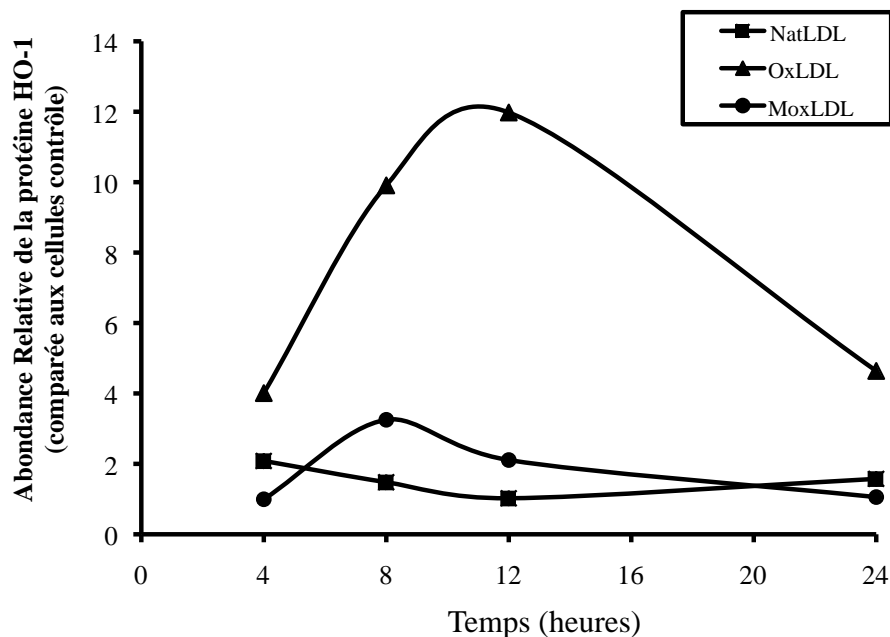


Figure III-5: Effet des LDL sur l'expression de la *hmox-1*, au niveau ARNm (A) et protéique (B et C). Les cellules EAhy926 ont été incubées à des temps croissants (4, 8, 12 et 24 heures) en présence de LDL natives ou modifiées (100 μ g/ml). (A) **Abondance relative des ARNm *hmox-1*** avec la *GAPDH* comme "housekeeping gene". (B) **Western blot pour la HO-1** L'extraction protéique totale et le Western blot ont été réalisées selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes. La protéine d'intérêt est visualisable à 33 kDa et le contrôle de charge, l' α -tubuline se situe à 55 kDa. (C) **Analyse quantitative du Western blot illustré en (B).**

cellules endothéliales avec des OxLDL. Cependant, la présence de Trolox n'a aucun effet sur l'abondance nucléaire de Nrf2, suggérant que cette translocation nucléaire n'est pas ROS-dépendante. Cependant, l'accumulation nucléaire de Nrf2 induite par le contrôle positif, du SIN-1, est diminuée en présence de Trolox, indiquant que cet antioxydant est bien actif à la concentration utilisée.

Des immunofluorescences par microscopie confocale ont également été réalisées montrant une translocation nucléaire accrue de Nrf2 déjà après 3 heures de stimulation avec 100 µg/ml de LDL modifiées comparée aux conditions contrôle et LDL (données non montrées).

2.2.2. Etude de l'effet des LDL sur l'expression d'un gène cible de Nrf2, *hmx-1*

*2.2.2.1. Les LDL modifiées induisent une surexpression de *hmx-1* au niveau ARNm*

Lorsque les cellules subissent un stress oxydatif, elles réagissent en induisant la surexpression de gènes antioxydants, dont la *hmx-1* codant la hème oxygénase HO-1, afin de contrecarrer les effets néfastes de l'accumulation de ROS, via notamment la libération de bilirubine et de monoxyde de carbone. L'expression d'une partie de ces gènes antioxydants, dont *hmx-1*, est induite par le facteur de transcription Nrf2 suite à sa translocation nucléaire et sa fixation à la séquence consensus ARE située dans le promoteur de ces gènes antioxydants. Afin de confirmer indirectement l'activation de Nrf2, une cinétique de l'abondance en ARNm d'*hmx-1*, a été réalisée. Pour cela, une RT-PCR en temps réel a été réalisée à partir d'extraits totaux d'ARN de cellules EAhy926 stimulées avec 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées durant 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 heures. La GAPDH a été utilisée comme « housekeeping gene » pour la normalisation et les calculs effectués par la méthode des $\delta\delta Ct$. L'abondance relative de l'ARNm *hmx-1* pour les différentes conditions de stimulation est exprimée de manière relative à l'abondance de l'ARNm pour la condition contrôle. La cinétique, illustrée à la figure III-5A, montre un pic de surexpression après 6 heures de stimulation avec les OxLDL, où l'abondance est augmentée de 17X par rapport au contrôle. Pour les MoxLDL, une légère surexpression de *hmx-1* apparaît également après 6 heures de stimulation de presque 4 fois par rapport au contrôle. Cependant, l'incubation de cellules endothéliales en présence de LDL natives n'a aucun effet sur l'expression de *hmx-1*. Les expériences ultérieures concernant l'étude de l'expression au niveau ARNm de *hmx-1* seront donc réalisées après 6 heures de stimulation avec des LDL natives ou modifiées.

2.2.2.2. Les LDL modifiées induisent une augmentation de l'abondance protéique d'HO-1

Après avoir évalué l'effet des LDL natives ou modifiées sur l'expression de *hmx-1* au niveau messenger, l'étude de cet effet a également été réalisée au niveau protéique par analyse en Western blot ciblant HO-1. Pour confirmer la surexpression de HO-1 au niveau protéique, des extraits de protéines totales ont été réalisés après 4, 8, 12 et 24 heures de stimulation avec 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées. Une bande correspondant à la protéine HO-1 est observée à un poids moléculaire de 33 kDa (Figure III-5B). Bien que les cellules endothéliales EAhy926 incubées en présence de OxLDL ou de MoxLDL surexpriment la protéine HO-1 entre 8 et 12 heures de stimulation, la surexpression la plus importante est observée en présence de OxLDL. Par contre, la surexpression de la protéine HO-1 n'est pas observée dans les conditions contrôles et LDL natives. En effet, étant donné qu'aucune production de ROS et qu'aucune activation de Nrf2 n'apparaissent dans ces conditions, aucune surexpression de gènes cibles comme *hmx-1* n'est observée. Le contrôle de charge,

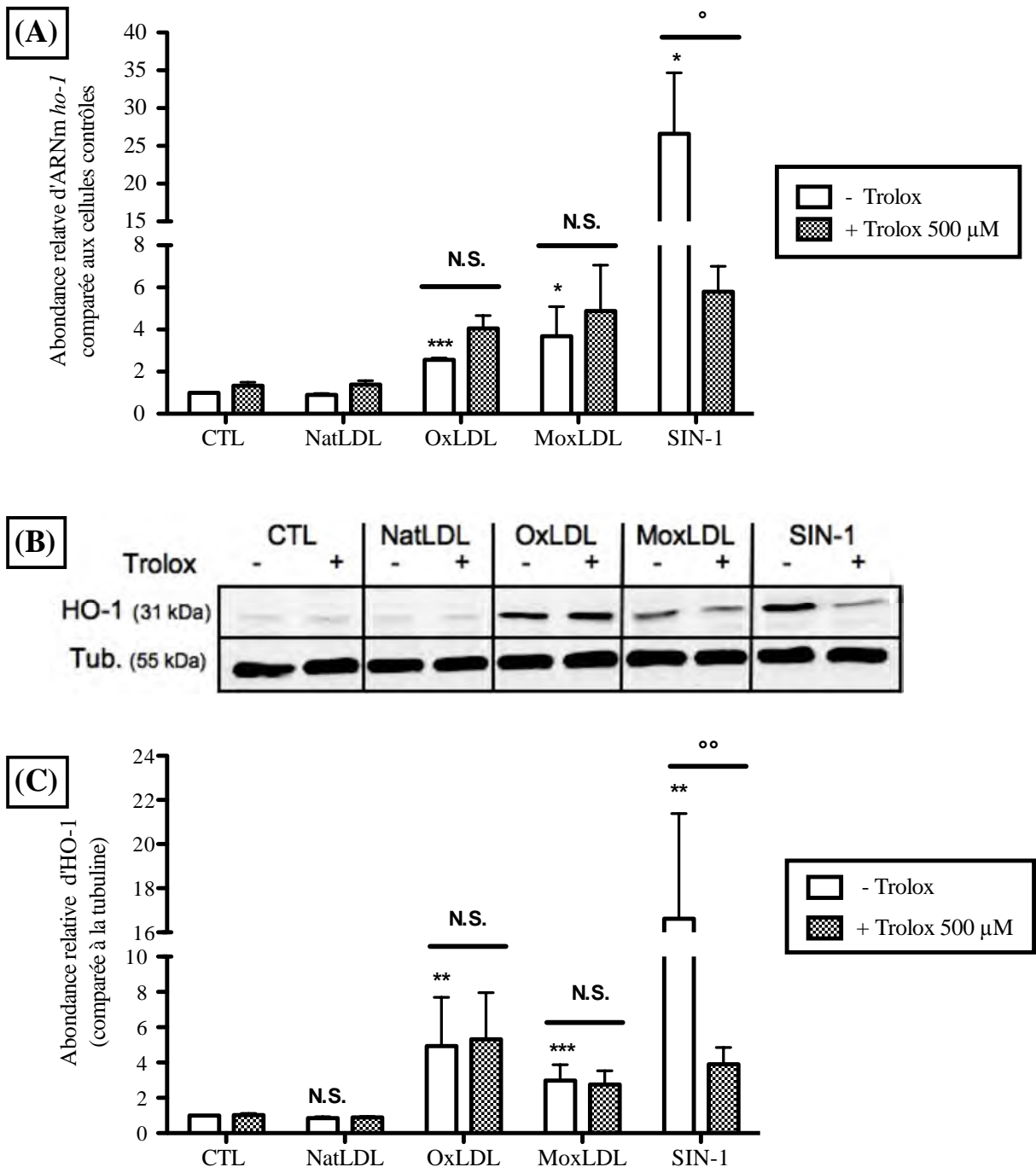


Figure III-6: Effet du Trolox sur la surexpression de *hox-1* induite par les LDL modifiées.

Les cellules EAhy926 ont été incubées à 6 heures en présence de 100 μg/ml de LDL natives ou modifiées avec ou sans Trolox (500 μM). **(A) Mesure de l'abondance en ARNm *hox-1*.** L'extraction et la RT-PCR ont été réalisées selon les protocoles décrits dans le chapitre Matériels et Méthodes. La *GAPDH* a été utilisée comme HKG et l'abondance relative obtenue a été calculée par la méthode des $\delta\delta C_t$. Les résultats sont exprimés de manière relative par rapport aux cellules contrôles et en tant que moyenne \pm SEM (n=3). **(B) Analyse en Western blot de la HO-1.** L'extraction protéique et le Western Blot ont été réalisés selon le protocole décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. HO-1 est visualisé à 33 kDa tandis que l' α -tubuline, visible à 55 kDa, a été utilisée comme contrôle de charge. **(C) Analyse quantitative du Western blot illustré en (B).** N.S. = différence statistiquement non significative par rapport au CTL, ou en absence de Trolox. ** et *** = différence statistiquement significative ($p < 0.01$ et $p < 0.001$) par rapport au CTL. °, °° et °°° = différence statistiquement significative ($p < 0,05$, $p < 0.01$ et $p < 0.00$) par rapport aux conditions sans Trolox. #### = différence statistiquement significative ($p < 0.001$) par rapport aux MoxLDL.

l' α -tubuline, apparaît pour toutes les conditions et tous les temps, à la même intensité au poids moléculaire de 55 kDa. L'analyse quantitative du Western blot confirme bien un pic de surexpression entre 8 et 12 heures pour les OxLDL et un pic moins intense, décalé vers 6 heures, pour les MoxLDL (Figure III-5C). Cette expérience a été répétée 3 fois et la figure III-5C illustre une expérience représentative.

2.2.2.3. *La présence d'un antioxydant, le Trolox, n'a aucun effet sur la surexpression de *hmx-1* induite par les LDL modifiées*

Etant donné que les données déjà obtenues avec la sonde et le Trolox sur la transactivation de Nrf2, suggèrent l'absence d'un stress oxydatif avec les OxLDL, nous avons voulu tester les effets du Trolox sur la surexpression de *hmx-1*. Une RT-PCR quantitative a donc été réalisée suite à une stimulation des cellules EAhy926 avec 100 μ g/ml de LDL natives ou modifiées durant 6 heures en présence ou non de Trolox (Figure III-6A). La GAPDH a été utilisée comme « housekeeping gene » pour la normalisation et les calculs effectués par la méthode des $\delta\delta$ Ct. Comme pour tous nos résultats obtenus par RT-PCR quantitative, l'abondance relative de l'ARNm *hmx-1* pour les différentes conditions stimulées est exprimée de manière relative par rapport à l'abondance de l'ARNm de la condition contrôle. Bien que le Trolox permette la diminution de la production de ROS induite par les MoxLDL, de la translocation nucléaire et de l'activation de Nrf2 induite par le SIN-1, l'antioxydant n'a pas d'effet sur l'expression de *hmx-1* induite par les OxLDL. Par ailleurs, une stimulation des cellules endothéliales avec du SIN-1 (1 mM) induit une forte surexpression de *hmx-1*. Cette surexpression est significativement réduite en présence de Trolox, suggérant que l'antioxydant, ainsi que la concentration utilisée sont effectifs.

Afin de confirmer ces résultats, une analyse de l'abondance protéique par Western blot a également été réalisée. Une extraction de protéines totales a ainsi été effectuée sur des cellules EAhy926 après 10 heures de stimulation avec 100 μ g/ml de LDL natives ou oxydées en présence ou non de Trolox (500 μ M). Comme le montrent les Figure 6B (Western blot) et 6C (analyse quantitative du Western blot), la protéine HO-1 est surexprimée en conditions OxLDL et MoxLDL, avec un effet plus marqué pour les OxLDL. Cependant, la présence de Trolox ne diminue pas l'abondance protéique de HO-1, alors qu'il ya un effet du Trolox pour le contrôle positif (SIN-1 1 mM). Ces résultats suggèrent que la surexpression de la *hmx-1* induite par les LDL oxydées dans les cellules endothéliales est ROS-indépendante, contrairement à ce qui a été décrit pour les macrophages murins RAW 264.7 (Calay et al, 2010).

2.2.3. Etude de l'invalidation de Nrf2 sur la surexpression d'*hmx-1* induite par les LDL modifiées

Etant donné qu'aucun effet du Trolox n'est observé sur la surexpression de *hmx-1* aux niveaux messenger et protéique, des siRNA anti-Nrf2 ont été utilisés afin d'invalider ce facteur de transcription et de vérifier son implication dans la surexpression de HO-1 induite par les LDL modifiées. L'abondance relative en ARNm *hmx-1* a été évaluée suite à la transfection des cellules EAhy926 avec des siRNA anti-Nrf2 ou des siRNA « non-targeting » et à leur stimulation pendant 6 heures avec des LDL natives ou modifiées (100 μ g/ml). Comme le montre la Figure III-7, la surexpression de *hmx-1* induite par les LDL modifiées est significativement réduite dans les cellules transfectées avec les siRNA anti-Nrf2. Par contre, la transfection des cellules EAhy926 avec des siRNA « non-targeting » n'a pas d'effet sur la surexpression de *hmx-1*. Ces résultats indiquent que le facteur de transcription Nrf2 est impliqué dans la surexpression de *hmx-1* induite par les LDL oxydées dans les cellules

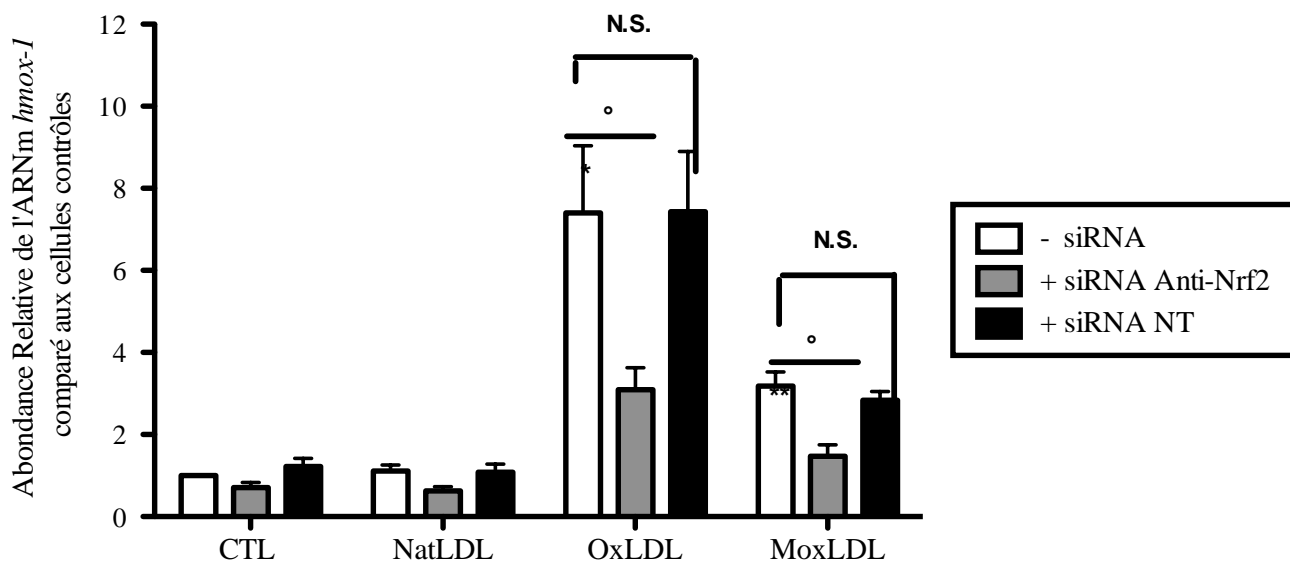


Figure III-7: Effet de l'invalidation du facteur de transcription Nrf2 sur la surexpression de *hmox-1*. Mesure de l'abondance relative de l'ARNm *hmox-1* suite à une stimulation en présence de 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées des cellules EAhy926 pendant 6 heures après une transfection avec les siRNA anti-Nrf2 ou Non-targeting pendant 36 heures. L'expression relative de Nrf2 a été évaluée par real-time RT-PCR comme décrit dans la chapitre Matériels et Méthodes. Le HKG utilisé est la *GAPDH* et les calculs ont été réalisés via la méthode des $\delta\delta Ct$. Les résultats sont exprimés de manière relative aux cellules contrôles fixées arbitrairement à 1 et en tant que moyenne \pm SEM (n=3). N.S. signifie une différence statistiquement non significative par rapport aux cellules non transfectées. * et ** signifient une différence statistiquement significative ($p < 0.05$ et $p < 0.01$), entre la condition en question et CTL. ° indique une différence statistiquement significative ($p < 0.05$) par rapport aux cellules non transfectées.

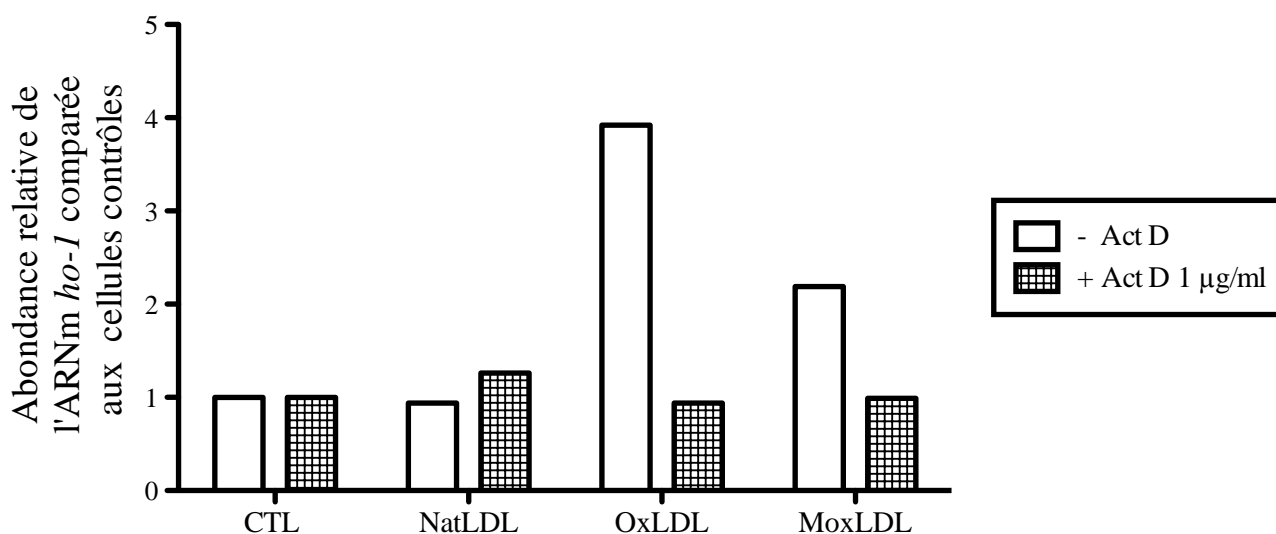


Figure III-8: Effet de l'actinomycine D sur l'abondance des ARNm *hmox-1* dans les cellules EAhy926 stimulées avec les LDL. L'abondance relative de l'ARNm *hmox-1* a été déterminée suite à une stimulation avec 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées des cellules EAhy926 pendant 6 heures après une incubation d'une heure en présence d'actinomycine D. L'expression relative de *hmox-1* a été évaluée par real-time RT-PCR comme décrit dans la chapitre Matériels et Méthodes. Le HKG utilisé est la *GAPDH* et les opérations mathématiques ont été réalisées via la méthode des $\delta\delta Ct$. Les résultats sont exprimés de manière relative aux cellules contrôles arbitrairement fixés à 1.

endothéliales. Nous constatons cependant une différence entre OxLDL et MoxLDL. Les OxLDL semblent capables d'activer Nrf2 et d'induire l'expression de *hmx-1* de manière ROS-indépendante, comme le suggèrent les expériences avec le Trolox. Pour les MoxLDL, bien qu'il y ait un stress oxydatif (Figure III-1), l'activation de Nrf2 est très faible. Nous n'avons pas pu la mettre en évidence dans l'expérience mesurant l'activité transactivatrice de Nrf2 après transfection des cellules avec le plasmide rapporteur (Figure III-3). L'induction de *hmx-1* avec les MoxLDL est d'ailleurs plus faible qu'avec les OxLDL (Figures III-5 et 7), mais Nrf2 semble néanmoins nécessaire pour cette faible induction, comme le suggèrent les résultats obtenus avec les siRNA anti-Nrf2 (Figure III-7).

2.3. Recherche de mécanismes explicatifs pour les effets différentiels Ox/Mox LDL

Au vu de ces résultats surprenants que nous avons obtenus respectivement avec les Ox- et les MoxLDL, nous nous sommes attelés à trouver des mécanismes explicatifs pour ces effets différentiels entre les OxLDL et MoxLDL, ainsi qu'à rechercher des mécanismes possibles d'activation de la voie Nrf2 qui soient ROS-indépendants.

2.3.1. Etude de la stabilité du messager *hmx-1*

Dans un premier temps, nous avons évalué si les différences d'abondance de *hmx-1* observées avec les OxLDL et MoxLDL ne pouvaient s'expliquer par des différences de stabilité des ARNm ou à une transcription plus active au niveau du promoteur du gène *hmx-1*.

Pour cela, une RT-PCR quantitative a été réalisée à partir d'ARNm extraits de cellules EAhy926 stimulées pendant 6 heures avec 100 µg/ml de LDL natives ou oxydées en présence ou non d'actinomycine D, un inhibiteur de la machinerie de transcription. Comme le montre la Figure III-8, en présence d'actinomycine D on n'observe plus l'augmentation d'abondance relative d'ARNm *hmx-1* induite par les OxLDL ou les MoxLDL. L'actinomycine D n'a aucun effet sur l'expression de *hmx-1* dans la condition LDL natives vu qu'aucune surexpression de *hmx-1* n'est observée dans cette condition. Ces données indiquent que la surexpression de *hmx-1* induite par les LDL oxydées dépend d'une transcription active, aussi bien pour la surexpression induite par les OxLDL que par les MoxLDL.

Nous avons également réalisé une expérience coup de sonde pour estimer la stabilité de l'ARN messager *hmx-1* dans les conditions OxLDL et MoxLDL. Pour cela, les cellules EAhy926 ont été stimulées pendant 4 heures avec des LDL natives ou modifiées avant d'ajouter l'actinomycine D et d'extraire l'ARNm après 2, 4, 6 ou 8 heures. D'après les résultats obtenus (non montrés), les temps de demi-vie des ARNm pour chaque condition étaient assez semblables ($t_{1/2}$ (CTL) = 2,46 heures, $t_{1/2}$ (NatLDL) = 1,68 heures, $t_{1/2}$ (OxLDL) = 2,19 heures et $t_{1/2}$ (MoxLDL) = 2,26 heures). Ces résultats suggèrent donc que les temps de demi-vie des ARNm *hmx-1* sont semblables suite à la stimulation des cellules endothéliales avec les OxLDL ou les MoxLDL, et qu'on ne peut probablement pas expliquer l'effet différentiel de ces deux types de LDL oxydées sur l'expression de la *hmx-1*, par des différences de stabilité au niveau des ARNm *hmx-1*.

2.3.2. Etude de la voie UPR

Hormis la voie d'activation de Nrf2 dépendante des ROS, de plus en plus de recherches montrent que Nrf2 peut être activé par phosphorylation de manière ROS-indépendante. Etant donné que le Trolox n'a pas d'effet sur l'activation de Nrf2 par les LDL oxydées, nous avons émis l'hypothèse d'une activation de Nrf2 par phosphorylation dans les conditions stimulées.

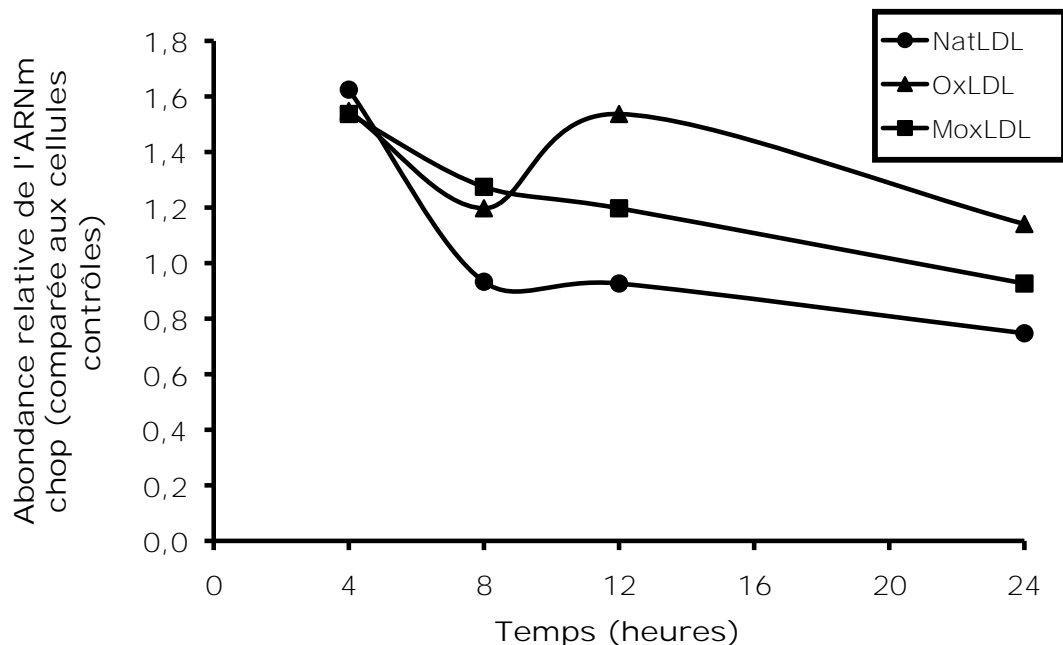
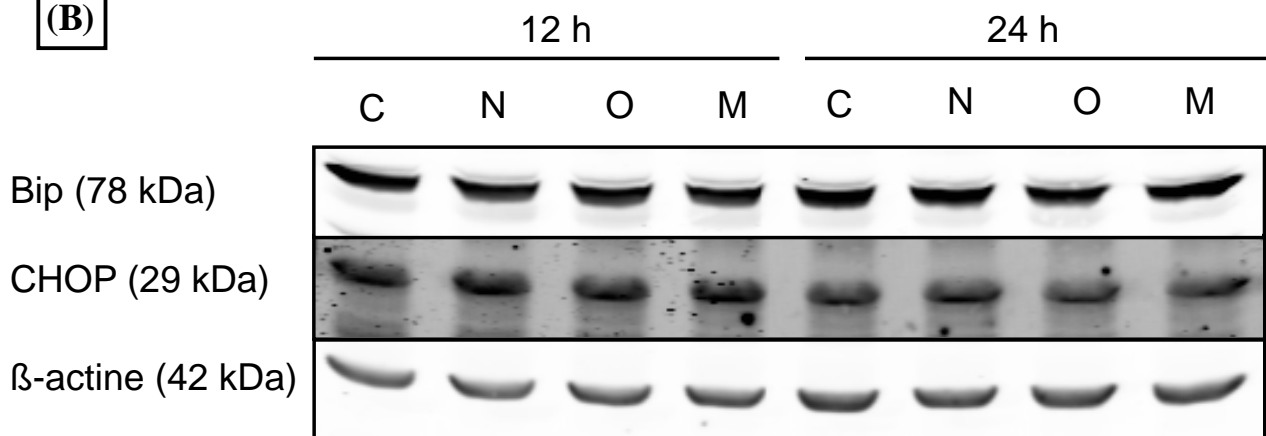
(A)**(B)**

Figure III-9: Etude de la voie UPR. (A) Mesure de l'abondance relative de l'ARNm *chop* suite à une stimulation des cellules EAhy926 avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives ou modifiées durant 6 heures. Le HKG utilisé est la *GAPDH* et les valeurs ont été calculées par la méthode des $\delta\delta\text{Ct}$. Les résultats sont exprimés de manière relative par rapport aux cellules contrôles arbitrairement fixées à 1. **(B) Etude de l'abondance de Bip et de CHOP.** Les cellules EAhy926 ont été incubées pendant 12 et 24 heures avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL natives ou modifiées. L'extraction protéique et le Western blot ont été réalisés selon les protocoles décrits dans le chapitre Matériels et Méthodes. Bip peut être visualisé à 78 kDa tandis de CHOP est visible à 29 kDa. La β -actine, observée à 42 kDa, a été utilisée comme contrôle de charge.

PERK, une protéine de la voie UPR, est une kinase décrite notamment pour activer Nrf2 par phosphorylation. Ainsi, afin de déterminer si PERK pouvait jouer un rôle dans l'activation de la voie Nrf2 par les LDL oxydées, nous nous sommes intéressés à l'UPR (ou unfolded protein response). Cette hypothèse semble plausible. En effet, la présence de LDL modifiées peut induire un stress oxydatif, une cause possible de perturbation du bon fonctionnement du réticulum endoplasmique et de l'accumulation de protéines de conformation anormales (Minamino and Kitakaze 2010; Tabas 2010), induisant l'activation de la réponse UPR. De plus, Sanson *et al.* stimulant des HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial cells) avec des OxLDL (200 µg/ml) observent une réponse UPR dans ces cellules (Sanson, Auge et al. 2009).

Afin d'évaluer l'implication de cette voie, nous avons étudié deux protéines reconnues pour être induites en cas d'UPR, Bip et CHOP. Bip/Grp78 est une chaperone du réticulum endoplasmique servant de régulateur principal de la voie UPR via la libération de IRE1, PERK et ATF6 activés en réponse à un stress du RE (cf. Introduction, Paragraphe 4.4). Elle est elle-même induite en cas d'UPR. CHOP est un facteur de transcription induisant l'expression des gènes favorisant l'apoptose en réponse à un stress du RE prolongé. CHOP inhibe l'expression de la protéine Bcl2, favorisant l'apoptose. *Chop* est généralement induit en cas d'UPR.

Afin d'étudier l'expression de Bip et CHOP, une évaluation de l'abondance relative en ARNm *chop* a tout d'abord été réalisée. Une RT-PCR en temps réel a été réalisée suite à une stimulation des cellules EAhy926 avec 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées durant 6 heures. La GAPDH a été utilisée comme « housekeeping gene » pour la normalisation et les calculs effectués par la méthode des $\delta\delta Ct$. Tout comme *hmox-1*, l'abondance relative de l'ARNm *chop* pour les différentes conditions stimulées, est exprimée de manière relative par rapport à l'abondance de l'ARNm de la condition contrôle. Comme le montre la Figure III-9A, l'abondance de l'ARNm *chop* ne varie pas ou peu, suggérant que la voie UPR n'est pas activée par les LDL oxydées dans les cellules endothéliales EAhy926.

Afin de vérifier ce résultat, nous avons procédé à une analyse par Western blot sur des extraits protéiques totaux de cellules EAhy926 stimulées pendant 12 ou 24 heures en présence de 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées. Tout comme les résultats obtenus en ARNm pour *chop*, la Figure III-9B montre que les LDL modifiées n'induisent aucune variation de l'abondance protéique relative de CHOP ou de Bip. Ces protéines ne sont donc pas surexprimées en présence de LDL oxydées, suggérant que la voie UPR n'est pas activée par Nrf2 par les LDL oxydées. La voie UPR ne serait donc pas responsable de l'activation ROS-indépendante de la voie Nrf2 par les LDL oxydées et de l'effet différentiel entre OxLDL et MoxLDL.

2.3.3. Etude des effets d'inhibiteurs de kinases sur l'activation de la voie Nrf2

Comme mentionné précédemment dans l'Introduction et comme décrit dans la littérature, diverses kinases possèdent la capacité d'activer la voie Nrf2. Hormis PERK, des kinases comme les PI3K (Phosphoinositol 3-kinases), des membres de la famille des MAPKinase (p38, ERK 1/ 2), la CK2 (caséine kinase 2), ... peuvent également activer directement ou indirectement le facteur de transcription Nrf2 par phosphorylation et induire son activation. Une fois activé, Nrf2 peut migrer dans le noyau afin d'induire la transcription de ses gènes cibles, dont *hmox-1*.

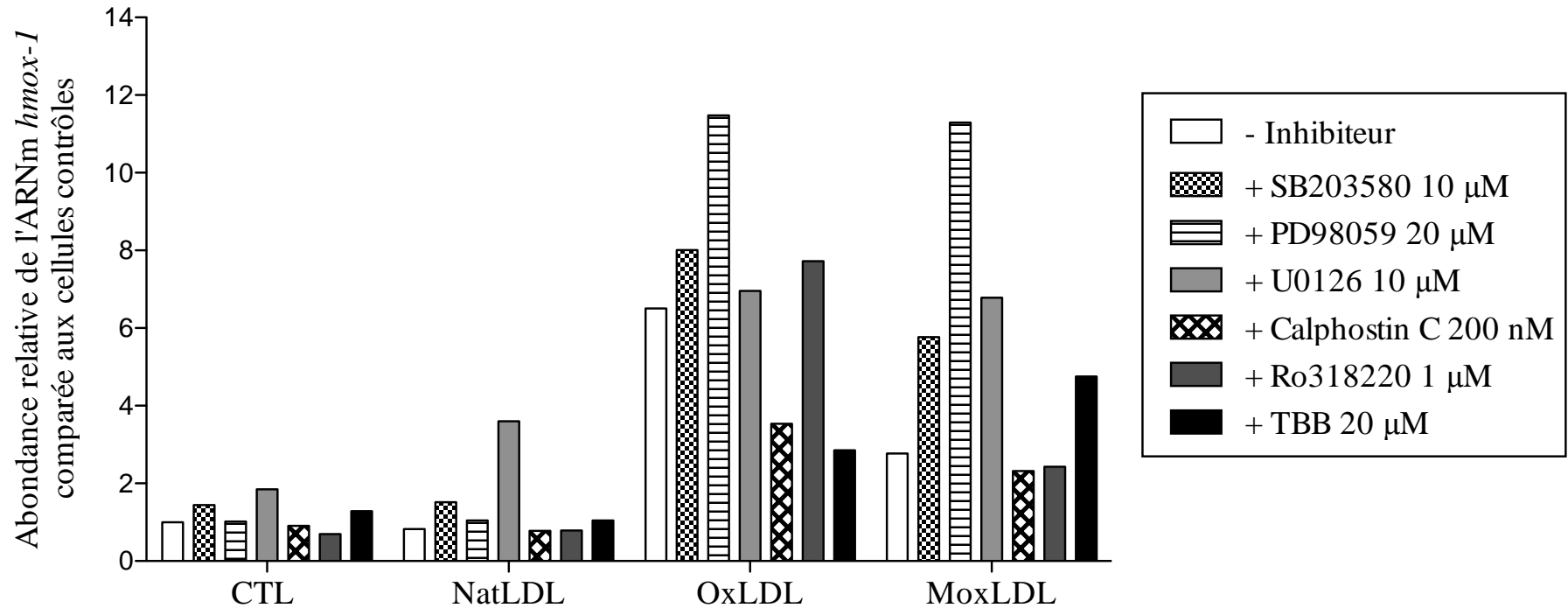


Figure III-10: Effets de différents inhibiteurs de kinases sur l'expression de *hmox-1*. Mesure de l'abondance relative de l'ARNm *hmox-1* suite à une stimulation des cellules EAhy926 en présence de 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées avec ou sans inhibiteur pendant 6 heures. L'expression relative de *hmox-1* a été évaluée par real-time RT-PCR comme décrit dans la chapitre Matériels et Méthodes. Le HKG utilisé est la *GAPDH* et les opérations mathématiques ont été réalisées via la méthode des $\delta\delta Ct$. Les résultats sont exprimés de manière relative aux cellules contrôles fixées arbitrairement à 1 et en tant que moyenne (n=2). (SB203580 = inhibiteur de p38, PD98059 = inhibiteur de ERK 1/2, U0126= inhibiteur de MEK 1/2, Calphostine C et Ro318220 = inhibiteurs de PKC et TBB = inhibiteur de CK2).

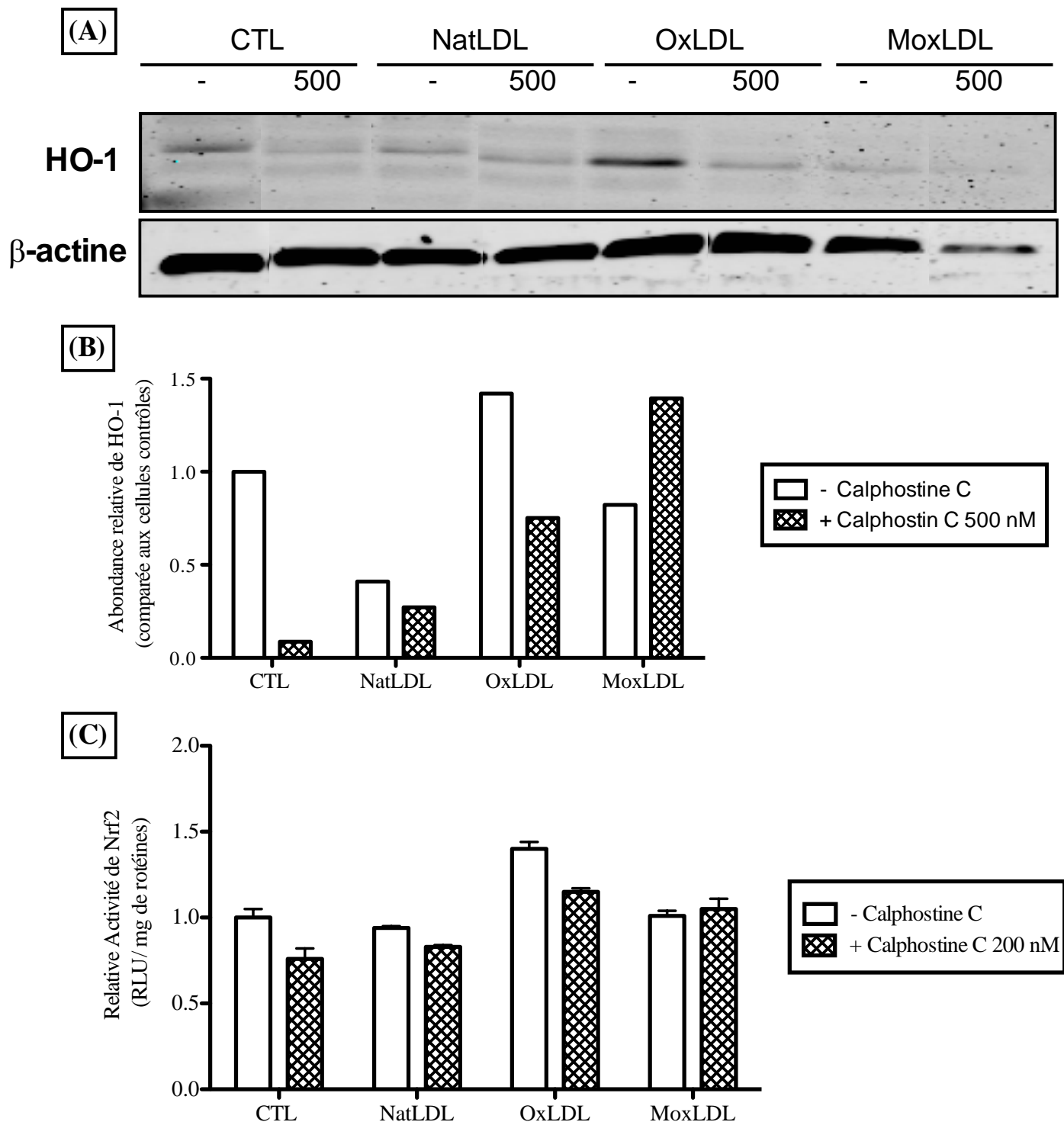


Figure III-11: Effet de la Calphostine C sur l'abondance de la protéine HO-1 et sur l'activité de Nrf2. (A) **Etude de l'abondance de HO-1.** Les cellules EAhy926 ont été incubées pendant 10 heures avec 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées en présence ou non de Calphostine C. L'extraction protéique et le Western blot ont été réalisés selon les protocoles décrits dans le chapitre Matériels et Méthodes. HO-1 est visualisable à 33 kDa tandis que le contrôle de charge, la β-actine est visible à 42 kDa. (B) **Analyse quantitative du Western blot illustré en (A).** (C) **Mesure de l'activité transactivatrice de Nrf2 en réponse à une stimulation avec des LDL en présence ou non de Calphostine C.** Cette mesure s'opère après 24 heures de stimulation avec les LDL natives ou oxydées (100 µg/ml) avec ou sans Calphostine C (200 nM). Un système rapporteur en Single Luciferase a été utilisé (pARE-luc). Ces résultats sont exprimés de manière relative aux cellules contrôle arbitrairement fixées à 1.

III. Résultats

Afin d'étudier le rôle possible de ces kinases dans l'activation de la voie Nrf2 par les LDL oxydées, divers inhibiteurs de kinases ont été utilisés : SB203580 à 10 μ M (p38), PD98059 à 20 μ M (ERK 1/2), U0126 à 10 μ M (MEK 1/2), Calphostine C à 200 nM et RO318220 à 1 μ M (PKC), Rottlérine à 2 ou 10 μ M (PKC δ) et TBB à 20 μ M (CK2).

Dans un premier temps, afin de trouver le ou les meilleur(s) candidat(s), nous avons procédé à la mesure de l'abondance en ARNm de *hmx-1* en présence ou non des divers inhibiteurs. Pour cela, une RT-PCR en temps réel a été réalisée à partir d'extraits totaux d'ARN de cellules EAhy926 stimulées avec 100 μ g/ml de LDL natives ou modifiées durant 6 heures en présence ou non d'inhibiteurs de kinases. Comme le montre la Figure III-10, la Calphostine C diminue la surexpression de *hmx-1* induite par les OxLDL, avec un effet moins important dans la condition MoxLDL. Les autres inhibiteurs ne modifient pas ou augmentent la surexpression de *hmx-1* induite par les LDL oxydées.

Les PKC semblent donc être impliquées dans la surexpression de *hmx-1* par les OxLDL. Dès lors, nous avons étudié l'effet de la Calphostine C sur l'expression de HO-1, au niveau protéique. Nous avons donc procédé à une analyse par Western blot sur des extraits protéiques totaux de cellules EAhy926 stimulées 10 heures avec 100 μ g/ml de LDL natives ou modifiées, en présence ou non de Calphostine C. La Figure III-11A montre une surexpression de HO-1 en condition OxLDL, comme observé précédemment. Cependant, en présence de Calphostine C la surexpression induite par les OxLDL disparaît. Ces résultats confirment que les PKC jouent un rôle dans la surexpression de HO-1 par les OxLDL dans les cellules endothéliales. On pourrait donc supposer que la surexpression de HO-1 est dépendante de l'activation de Nrf2, elle-même dépendante de sa phosphorylation par une PKC.

Afin de vérifier si l'activation du facteur de transcription Nrf2 est influencée par des kinases, et plus particulièrement par une PKC, nous avons mesuré l'activité transactivatrice de Nrf2 en présence ou non de Calphostine C. Pour ce faire, nous avons transfecté les cellules EAhy926 avec un système rapporteur en simple luciférase (pARE-luc) avant de les stimuler 24 heures avec 100 μ g/ml de LDL natives ou modifiées en présence ou non de Calphostine C. Comme le montre la figure III-11B, aucune condition n'induit une augmentation de l'activité transactivatrice de Nrf2 par rapport au contrôle, à part la condition OxLDL comme observé auparavant. Cependant, la présence de Calphostine C cause une diminution de l'activité transactivatrice de Nrf2 induite par les OxLDL. Bien que cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et doit être confirmée, l'inhibition des PKC par la Calphostine C induit une diminution de l'activation de la voie Nrf2, suggérant que ces kinases jouent un rôle important dans l'activation de la voie Nrf2 par les OxLDL.

Il existe 11 isoformes de la PKC. Au vu de la littérature, la PKC δ semble être une isoforme particulièrement importante dans l'activation de Nrf2 par phosphorylation (Niture, Jain et al. 2009). Afin de vérifier l'implication possible de cette isoforme dans l'activation de Nrf2, nous avons premièrement procédé à une mesure de l'abondance en ARNm de *hmx-1* en présence de Rottlérine, un inhibiteur de la PKC δ . Pour cela, une RT-PCR quantitative a été réalisée à partir d'extraits totaux d'ARN de cellules EAhy926 stimulées avec 100 μ g/ml de LDL natives ou modifiées durant 6 heures en présence ou non de Rottlérine (10 μ M). Comme le montre la Figure III-12A, *hmx-1* est surexprimé dans les conditions OxLDL et MoxLDL par rapport à la condition contrôle. Cependant, la Rottlérine induit une surexpression importante de l'abondance relative de l'ARNm *hmx-1* dans toutes les conditions. Cette surexpression de *hmx-1* par la Rottlérine a été décrite dans la littérature (Park, Lim et al. 2010) et est indépendante de son effet inhibiteur de la PKC δ . Ce résultat sera discuté plus loin dans la Discussion générale au Chapitre IV.

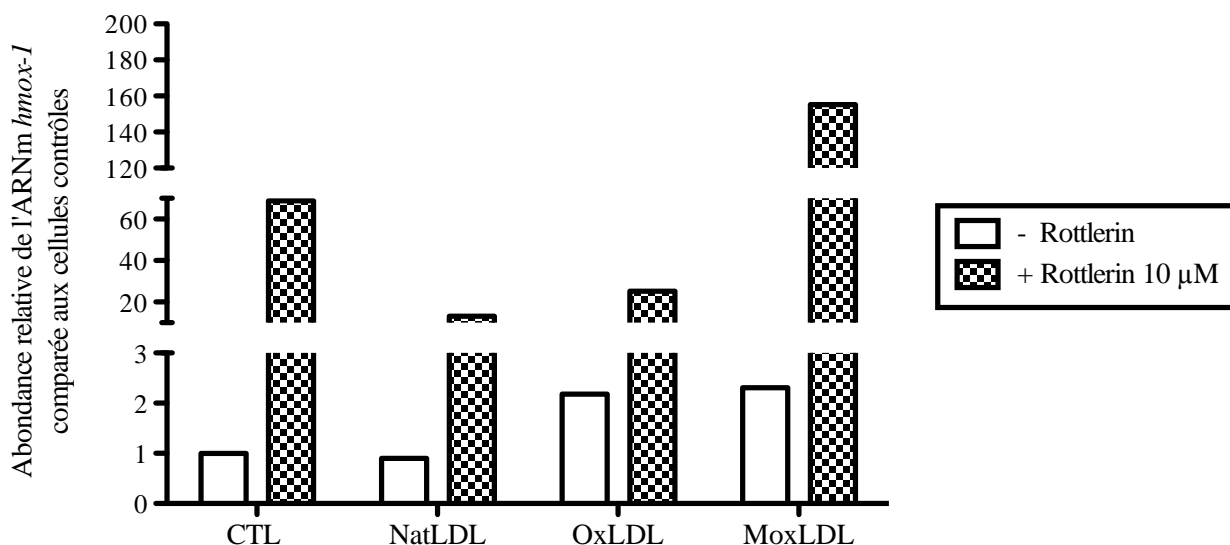
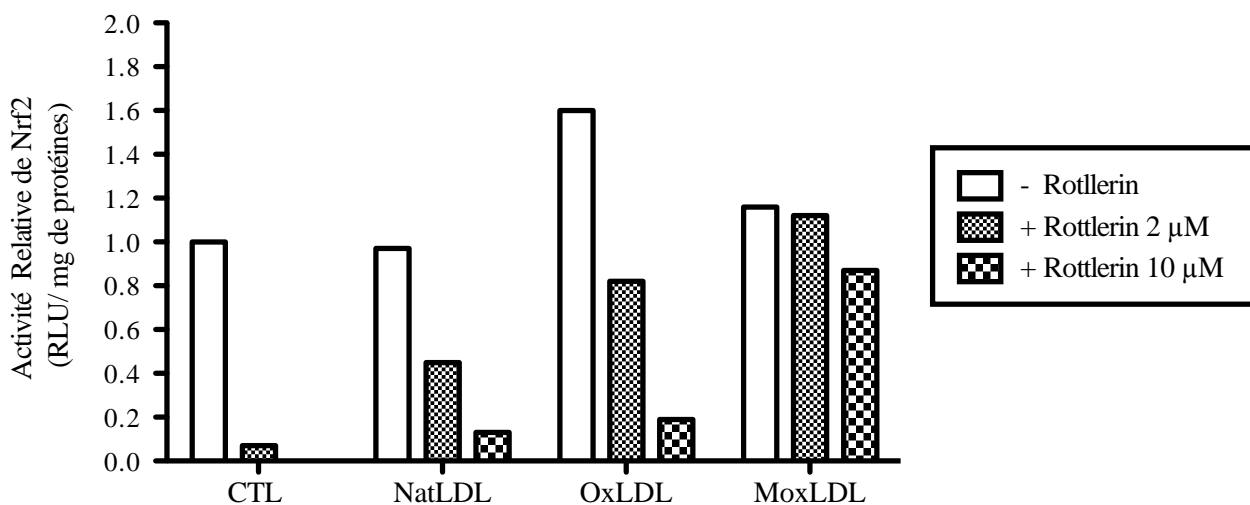
(A)**(B)**

Figure III-12: Effet de la Rottlérine sur l'expression de *hmox-1* et l'activité de Nrf2. (A) Mesure de l'abondance relative en ARNm *hmox-1*. Les cellules EAhy926 ont été incubées pendant 6 heures avec 100 µg/ml de LDL natives ou modifiées en présence ou non de Rottlérine 10 µM. L'extraction et la RT-PCR ont été réalisées selon le protocole décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. La GAPDH a été utilisée comme HKG et l'abondance relative obtenue a été calculée par la méthode des $\delta\delta Ct$. Les résultats sont exprimés de manière relative aux cellules contrôles fixées arbitrairement à 1. **(B) Mesure de l'activité transactivatrice de Nrf2 en réponse à une stimulation avec des LDL en présence ou non de Rottlérine.** Cette mesure s'opère après de 24 heures stimulation avec des LDL natives ou oxydées (100 µg/ml) avec ou sans Rottlérine (2 ou 10 µM). Un système rapporteur en Single Luciferase a été utilisé (pARE-luc). Ces résultats sont exprimés de manière relative aux cellules contrôles fixées arbitrairement à 1.

Comme pour la Calphostine C, nous avons évalué l'activité transactivatrice de Nrf2 en présence de Rottlérine afin de déterminer le rôle de la PKC δ sur l'activation de la voie Nrf2. Ainsi, les cellules EAhy926 ont été transfectées avec un système rapporteur en simple luciférase (pARE-luc) avant d'être stimulées 24 heures avec 100 μ g/ml de LDL natives ou modifiées en présence ou non de Rottlérine à une concentration de 2 μ M ou 10 μ M. Comme le montre la Figure III-12, seule la condition OxLDL induit une activité relative de Nrf2 supérieure à la condition contrôle. L'ajout de Rottlérine permet cependant, de réduire fortement l'activité de Nrf2 dans toutes les conditions, à l'exception des MoxLDL. On observe également que plus la concentration en Rottlérine est importante, plus l'activité de Nrf2 est diminuée.

Les résultats obtenus avec les inhibiteurs de kinases suggèrent donc que les PKC, et plus particulièrement la PKC δ , pourraient induire l'activation du facteur de transcription Nrf2 par phosphorylation suite à une stimulation des cellules endothéliales EAhy926 avec des OxLDL, et des MoxLDL, dans une moindre mesure.

IV. Discussion, perspectives et conclusion

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire et dégénérative des artères de moyen et gros calibres, engendrée par de nombreux facteurs comme le tabac, la sédentarité et l'hypercholestérolémie. De plus, les modifications oxydatives des LDL contribuent fortement à l'athérogenèse. Bien que les mécanismes d'oxydation des LDL *in vivo* ne sont pas encore totalement élucidés, un modèle d'oxydation est souvent utilisé *in vitro*, utilisant les ions cuivriques. Bien que ce modèle soit utilisé depuis longtemps et engendre bien l'oxydation des LDL *in vitro* (Esterbauer, Gebicki et al. 1992), sa pertinence au niveau physiologique est de plus en plus remise en question. En effet, les concentrations en cuivre utilisées pour oxyder les LDL *in vitro* sont de l'ordre de 10 à 20 μM , largement supérieures aux concentrations physiologiques, de l'ordre de 0,3 μM (Ziouzenkova, Sevanian et al. 1998). De plus, il n'est pas certain que des ions cuivriques soient présents dans les athéromes. Plus récemment, d'autres modèles d'oxydation ont été proposés (pour une revue, voir (Yoshida and Kisugi 2010), via des enzymes telles les lipoxygénases et la myéloperoxydase (MPO). C'est ce dernier modèle d'oxydation que nous avons choisi d'étudier. La MPO est une enzyme présente dans les granules azurophiles des neutrophiles, catalysant la formation d'acide hypochloreux à partir de chlore et de peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme ainsi que des LDL oxydées à la MPO ont été localisées dans les plaques athéromateuses suggérant le rôle potentiel de cette enzyme dans les modifications des LDL *in vivo* (Zhang, Brennan et al. 2001). De plus, les concentrations de MoxLDL que nous avons utilisées *in vitro* dans ce travail, correspondent à des concentrations patho-physiologiques observées chez des patients sous dialyse ou souffrant d'une maladie cardiovasculaire (Boudjeltia, Legssyer et al. 2006).

Les ions cuivriques et la MPO induisent des altérations différentes au niveau des LDL. En effet, l'oxydation des LDL avec des ions cuivre induit d'importantes modifications sur les fractions lipidiques et protéiques des LDL contrairement à l'oxydation des LDL à la MPO qui touche principalement la fraction protéique. En effet, l'oxydation des LDL avec des ions Cu^{2+} attaque premièrement les acides gras poly-insaturés de la fraction lipidique des LDL. En fonction du ratio entre la concentration en LDL et en oxydant, les dérivés de l'oxydation lipidique (malondialdéhyde, hydroxynonénal, ...) peuvent également modifier la fraction protéique au niveau de l'apoB-100 (Esterbauer, Gebicki et al. 1992; Ziouzenkova, Sevanian et al. 1998; Zarev, Bonnefont-Rousselot et al. 2003). L'oxydation des LDL avec la MPO (MoxLDL) mène principalement à la modification de la partie protéique des LDL, induisant la formation entre autres de chlorotyrosines et dityrosines, mais peut aussi modifier la fraction lipidique en fonction du pH et de la présence d'hydroperoxydes (Spickett, Jerlich et al. 2000; Heinecke 2003). A cause des modifications de la fraction protéique sur les résidus lysines chargés positivement, les LDL modifiées présentent une vitesse de migration en gels d'agarose plus importante comparée aux LDL natives (figure II-1). Cette technique nous permet ainsi de vérifier si le processus d'oxydation s'est bien déroulé.

Alors que les effets des LDL oxydées au cuivre (ou OxLDL) sont largement étudiés et bien documentés, il y a moins d'informations disponibles sur les MoxLDL et leurs effets, et on ne trouve que peu de travaux comparant les deux types d'oxydation dans la littérature. Notre laboratoire s'est donc attaqué à l'étude comparative des Ox- et MoxLDL dans le cadre des thèses de Damien Calay et Ludmilla Caesens-Koenig et c'est dans le contexte que s'inscrit ce mémoire dans lequel nous avons procédé à l'évaluation des effets différentiels entre les OxLDL et les MoxLDL dans les cellules endothéliales humaines EAhy926, provenant de la fusion entre des HUVECs et des cellules A549 (cfr Chapitre II Matériels et Méthodes, Paragraphe 1.1).

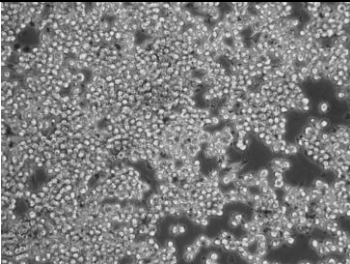
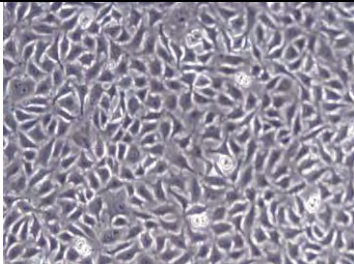
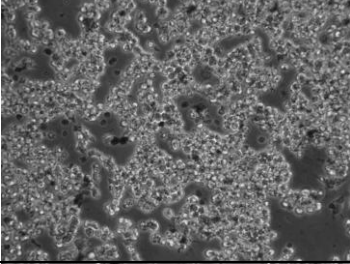
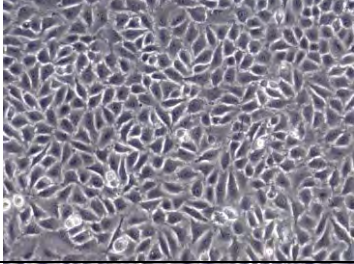
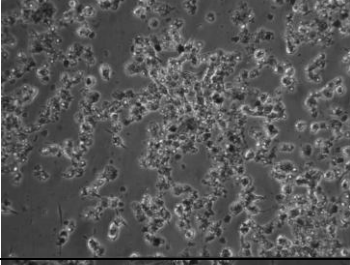
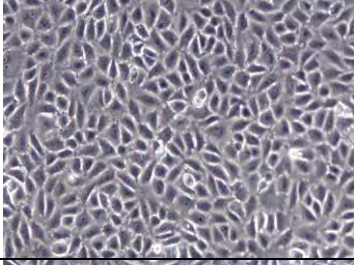
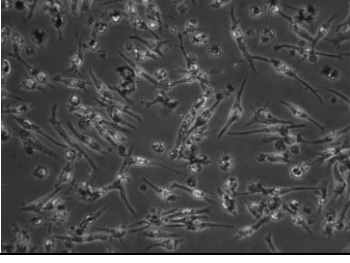
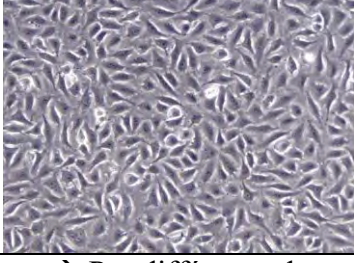
		Macrophages (RAW 264.7)	Cellules endothéliales (EAhy926)
Morphologie	CTL		
	NatLDL		
	OxLDL		
	MoxLDL		
		→ Différence de morphologie lors de l'incubation avec les LDL modifiées	→ Pas différence de morphologie lors de l'incubation avec les LDL modifiées
Production de ROS		MoxLDL > OxLDL	MoxLDL > OxLDL
Activation de Nrf2		MoxLDL > OxLDL	OxLDL > MoxLDL
Surexpression de <i>hmox-1</i>		MoxLDL > OxLDL	OxLDL > MoxLDL

Tableau IV-1: Tableau comparatifs cellules endothéliales (EAhy926) et macrophages murins (RAW 264.7)

IV. Discussion, perspectives et conclusion

Ludmilla Caesens-Koenig (mémoire de Master 2009-2010), avait déjà montré que les LDL natives ou modifiées n'avaient pas d'effet cytotoxique sur les cellules endothéliales EAhy926. Elle avait également mis au point un système prototype de « shear stress ». Nous avons focalisé notre étude sur l'effet des LDL modifiées sur l'activation de la voie Nrf2.

Dans un premier temps, nous avons évalué la production de ROS et l'activation du facteur de transcription Nrf2 en présence de LDL modifiées. En effet, Nrf2 est connu pour être activé suite à un stress oxydatif, permettant sa translocation dans le noyau et sa liaison au site consensus ARE, présent dans les promoteurs de gènes de détoxification et antioxydants. Afin d'évaluer l'effet des LDL modifiées sur la production de ROS, nous avons stimulé les cellules EAhy926 avec les LDL natives ou modifiées en présence de la sonde fluorescente H₂DCF-DA. Comme le montre la figure III-1, les LDL oxydées à la MPO génèrent un stress oxydatif dans les cellules endothéliales, augmenté de 6 fois par rapport à la condition contrôle. Cependant, les LDL natives ou oxydées au cuivre ne semblent avoir aucun effet sur la production de ROS, telle que détectée par la sonde H₂DCF-DA. Ces résultats laissent donc suggérer que les MoxLDL génèrent un stress oxydatif intracellulaire et permettrait donc une activation de la voie Nrf2, comme déjà démontré dans les macrophages murins RAW264.7 par Damien Calay (Calay, Rousseau et al. 2010). La production de ROS engendrée par l'incubation des cellules endothéliales avec les MoxLDL est donc supérieure à la production de ROS induite par les OxLDL, mais la mesure du stress oxydatif reste limitée par la sensibilité de la sonde H₂DCF-DA.

Nous avons ensuite évalué l'activité transactivatrice de Nrf2 dans les cellules EAhy926 stimulées avec les LDL natives ou modifiées. Dans un système utilisant un rapporteur en simple luciférase, nous avons mis en évidence que les LDL oxydées à la MPO, de manière surprenante ne permettent pas l'activation du facteur de transcription Nrf2, contrairement aux OxLDL qui induisent une augmentation de l'activité transactivatrice de Nrf2 de l'ordre de 1,7 fois, par rapport à la condition contrôle. Comme attendu, les LDL natives n'ont aucun effet étant donné qu'aucune production de ROS n'est observée dans cette condition de stimulation. A notre surprise, l'hypothèse selon laquelle les MoxLDL engendrant un stress oxydatif plus important que les OxLDL activeraient la voie Nrf2, ne s'est donc pas avérée exacte. Ces résultats sont également en désaccord avec ce qui a été observé dans les macrophages murins (Tableau IV-1). En effet, nous observons une discordance entre les effets des OxLDL et des MoxLDL sur la production de ROS et l'activation de Nrf2. Dans le modèle de macrophages murins, lors d'une stimulation des cellules RAW264.7 avec les LDL natives ou modifiées, on observe une activité transactivatrice de Nrf2 supérieure pour les MoxLDL par rapport aux OxLDL, des résultats en accord avec la production de ROS, également plus importante en présence de MoxLDL (Calay, Rousseau et al. 2010).

Afin de confirmer ces effets des LDL modifiées sur l'activation de Nrf2, nous avons évalué, par RT-PCR en temps réel et par Western blot, les effets des LDL natives ou modifiées sur l'expression d'un gène cible de Nrf2, l'hème oxygénase 1 (*hmx-1*). Comme montré dans les Figures III-5A, 5B et 5C, nous observons une surexpression de *hmx-1* et au niveau ARNm et au niveau de la protéine HO-1 en présence de LDL modifiées, mais avec un effet plus important en présence des OxLDL que des MoxLDL, tout au long de la cinétique. Ces résultats sont toujours en discordance avec la production de ROS mais en accord avec l'activité transactivatrice de Nrf2. Par ailleurs, dans le modèle de macrophages murins, une surexpression plus importante de *hmx-1* est observée dans les macrophages stimulés avec les MoxLDL par rapport aux OxLDL, en accord avec une production de ROS et une activité transactivatrice de Nrf2 supérieures lors de la stimulation avec les LDL oxydées à la myéloperoxydase.

Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie Nrf2 par les LDL oxydées dans les cellules endothéliales est complexe et implique des acteurs moléculaires différents que ceux présents dans les macrophages murins. A la vue de ces effets différentiels entre les macrophages murins RAW264.7 et les cellules endothéliales EAhy926, ainsi qu'entre les OxLDL et les MoxLDL, nous pouvons proposer quelques hypothèses.

Premièrement, les macrophages et les cellules endothéliales n'expriment pas les mêmes récepteurs « scavenger » capables d'internaliser les LDL oxydées. De plus, seuls les macrophages sont capables de former des cellules spumeuses à l'origine de la formation des plaques athéromateuses. En effet, les macrophages expriment un nombre plus important (environ 10) de récepteurs « scavenger » tels que les récepteurs SR-AI, SR-AII, SR-BI, CD-36, MARCO, ... tandis que les cellules endothéliales expriment LOX-1, CL-P1, SREC I et II ... (Adachi, Tsujimoto et al. 1997; Itabe 2003; Adachi and Tsujimoto 2006; Pluddemann, Neyen et al. 2007). Ces différences dans les combinaisons de récepteurs « scavenger » exprimés à la surface des macrophages et cellules endothéliales, pourraient aussi expliquer la formation de cellules spumeuses par les macrophages incubés en présence de LDL modifiées, contrairement aux cellules endothéliales n'accumulant apparemment pas de gouttelettes lipidiques en présence de LDL modifiées (thèse de Damien Calay). Par ailleurs, les récepteurs aux MoxLDL ne sont pas encore clairement identifiés, contrairement aux récepteurs aux LDL oxydées avec des ions cuivre ou acétylées. L'identification du ou des récepteurs aux MoxLDL sur les cellules endothéliales pourrait contribuer à la compréhension des effets différentiels entre OxLDL et MoxLDL dans ce type cellulaire. Ludmilla Caesens-Koenig a commencé à tester une série d'anticorps ciblés sur les récepteurs « scavenger » pour essayer de voir quels seraient ceux requis pour le stress oxydatif induit par les MoxLDL.

Deuxièmement, dans certains types cellulaires comme les cellules endothéliales, on peut observer une tendance à la compartimentalisation des voies de signalisation redox par les cavéoles et les radeaux lipidiques. Les radeaux lipidiques sont des microdomaines de la membrane plasmique enrichis en cholestérol, sphingolipides, protéines à ancre GPI et lipides à chaînes acyl saturées. Les cavéoles sont des radeaux lipidiques spécialisés contenant des cavéolines, protéines structurant les cavéoles, mais recrutant également de nombreuses protéines de signalisation. En réponse à divers stimuli, les radeaux lipidiques fonctionnent comme des plateformes de signalisation, servant à recruter certains récepteurs comme le récepteur au TNF- α , les récepteurs à l'insuline, ... ou encore différentes molécules de signalisation (Zhang, Yi et al. 2006). Cette réponse à divers stimuli semble jouer un rôle important dans la signalisation transmembranaire de nombreuses cellules chez les mammifères. Diverses analyses ont montré que différentes classes de protéines se localisaient dans les radeaux lipidiques ou les cavéoles, comme des molécules de signalisation redox, conduisant à la production d'ions superoxydes et d'autres ROS principalement retrouvés au niveau des cellules endothéliales (Li, Zhang et al. 2007; Patel and Insel 2009). Par exemple, en réponse à la présence de certains stimuli comme le FasL, le TNF- α ou l'endostatine, la NADPH oxydase s'active par agrégation de ses sous-unités, stimulant la production d'anions superoxydes dans les cellules endothéliales et contribuant au dysfonctionnement endothélial. De plus, il est bien décrit que la eNOS, mais également la HO-1, sont des protéines localisées dans les cavéoles et qui interagissent avec les cavéolines, cette interaction induisant une régulation négative de ces deux enzymes (Patel and Insel 2009).

Troisièmement, les cascades de signalisation permettant l'activation de Nrf2 pourraient être différentes en fonction des LDL modifiées utilisées. En effet, l'activation de la voie Nrf2 a souvent été décrite comme induite par des modifications oxydatives de KEAP-1, l'inhibiteur du facteur de transcription Nrf2, au niveau des résidus cystéines 151, 273 et 288. Ces modifications induisent un changement conformationnel de KEAP-1, permettant la

dissociation entre Nrf2 et son inhibiteur et permettant ainsi la translocation nucléaire et la liaison du facteur de transcription sur le site consensus ARE à l'origine de l'expression de gènes antioxydants et détoxifiants de phase II. Cependant, il est de plus en plus mis en évidence que des kinases peuvent aussi activer la voie Nrf2 par phosphorylation directe du facteur de transcription, indépendamment ou simultanément avec les modifications oxydatives de KEAP-1. Parmi les kinases les plus citées, nous retrouvons les PKC, la CK2, PERK, les membres de la voie des MAPKinases, ... (Niture, Jain et al. 2009; Niture, Kaspar et al. 2010). Par exemple, les équipes de Huang et de Bloom (Huang, Nguyen et al. 2002; Bloom and Jaiswal 2003) ont mis en évidence que les PKC étaient capables de phosphoryler le résidu Ser40 de Nrf2, à l'origine de son activation.

L'absence d'effet du Trolox sur l'activation de Nrf2 et l'induction de la *hmx-1* par les OxLDL, plaidant en faveur d'une activation de la voie Nrf2 ROS-indépendante, nous nous sommes donc interrogés sur les possibilités de voies d'activation de Nrf2 via des phosphorylations de Nrf2 dans les conditions OxLDL. Tout d'abord, nous avons pensé que la réponse UPR pourrait être impliquée dans l'activation de Nrf2 par les OxLDL et expliquer les effets différentiels entre les OxLDL et les MoxLDL. En effet, Nrf2 peut être activé par phosphorylation par la protéine PERK, une protéine activée lors de la réponse UPR (Cullinan, Zhang et al. 2003; Cullinan and Diehl 2004; Cullinan and Diehl 2006). En cas de stress du réticulum endoplasmique, la réponse UPR est induite afin de restaurer l'homéostasie cellulaire. Ce stress du réticulum peut être induit par un stress oxydatif, mais Sanson *et al.* (2009) ont également montré que des LDL oxydées pouvaient induire un stress du réticulum dans le modèle des HMEC-1 (human microvascular endothelial cells) (Sanson, Auge et al. 2009). Pour rappel, Bip maintient les 3 protéines effectrices de la voie UPR, à savoir ATF6, IRE1 et PERK inactif dans la lumière du RE. Cependant, suite à un stress du RE, Bip se détache au profit de protéines mal repliées accumulées dans le RE de ces 3 protéines transmembranaires, ce qui les active et initie la réponse UPR, caractérisée par la surexpression de gènes codant pour des protéines chaperones comme Bip ou des protéines impliquées dans l'apoptose comme CHOP. Lors de notre étude sur l'expression relative de l'ARNm *chop*, aucune variation n'a été observée dans les conditions LDL natives, ni LDL modifiées (figure III-9A). Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'étude de l'abondance protéique de CHOP et de BIP (figure III-9B). La voie UPR ne semble pas activée par les LDL oxydées, en tous les cas pour les temps d'incubation testés et ne peut donc expliquer la réponse différentielle des cellules endothéliales EAhy926 aux LDL oxydées au cuivre ou à la MPO. Il faut toutefois remarquer que la voie UPR pourrait être activée mais pour des incubations plus longues avec les LDL oxydées. En effet, lors de nos expériences, le temps d'incubation maximal était de 24 heures. Nrf2 étant activé par les LDL oxydées après 2 à 4 heures de stimulation (en fonction de la surexpression de *hmx-1*), une activation de la voie UPR après 24 heures de stimulation ne pourrait dès lors pas être responsable de l'activation de la voie Nrf2 par les LDL oxydées. Sanson *et al.* (2009) utilisent également des concentrations en LDL oxydées deux fois plus élevées.

Ensuite, afin d'évaluer l'implication ou non d'autres kinases dans l'activation de Nrf2, nous avons étudié l'effet de divers inhibiteurs de ces kinases par RT-PCR quantitative sur l'expression de la *hmx-1* dans des cellules EAhy926 stimulées avec les LDL natives ou modifiées. Comme le montre la figure III-10, l'inhibition de p38 et de ERK favorise la surexpression de *hmx-1* induite par les LDL oxydées. Par contre, seule la Calphostine C, un inhibiteur de PKC empêche la surexpression de *hmx-1*, avec un effet plus marqué pour les OxLDL. L'effet de la Calphostine C a donc été étudié sur l'activité transactivatrice de Nrf2 et sur l'abondance de la protéine HO-1. L'inhibition des PKC par la Calphostine C permet la diminution de l'activité de Nrf2 et de l'augmentation d'abondance de HO-1 induite par les OxLDL.

Les PKC, des sérine/thréonine kinases, existent sous 11 isoformes (α , β I, β II, γ , δ , ϵ , η , θ , μ , ξ , ι). Bien que le rôle spécifique de ces différentes isoenzymes dans l'activation de Nrf2 n'est pas encore connu, la PKC δ semble être la principale isoforme impliquée dans la phosphorylation de la Ser40 de Nrf2 conduisant à sa translocation dans le noyau et à l'induction de gènes cytoprotecteurs, comme *hmx-1*. Afin de vérifier l'implication de cette isoenzyme dans l'activation de la voie Nrf2 par les LDL oxydées dans les cellules endothéliales, la Rottlérine, un inhibiteur spécifique de la PKC δ , a été utilisé lors de l'étude de l'activité transactivatrice de Nrf2 et de l'expression de *hmx-1*. La Rottlérine a notamment été décrite pour inhiber la translocation nucléaire de Nrf2 en réponse à un antioxydant, le tBHQ (Niture, Jain et al. 2009). Comme le montre la Figure III-12B, la Rottlérine ajoutée aux cellules EAhy926 stimulées avec les LDL natives ou oxydées, a pour effet de diminuer l'activité de Nrf2. Cette diminution est fonction de la concentration en Rottlérine utilisée. En effet, plus la concentration est forte, plus l'effet inhibiteur de l'activation de Nrf2 est marqué. Cependant, la Rottlérine est loin d'être l'inhibiteur idéal puisqu'elle induit une surexpression de *hmx-1* dans toutes les conditions de stimulation des cellules endothéliales EAhy926 (Figure III-12A). Ce résultat est en accord avec des données récentes de la littérature. En effet, il a récemment été décrit que la Rottlérine induit la surexpression de *hmx-1* à elle seule via une production de ROS, l'activation de p38 et de ERK et la translocation nucléaire de Nrf2 dans les cellules de cancer du colon humain HT29. De plus, l'invalidation de l'expression de la PKC δ par des siRNA ou la surexpression de PKC δ n'a aucun effet sur cette induction, suggérant que la Rottlérine induit l'expression de *hmx-1* par une voie indépendante de la PKC δ (Park, Lim et al. 2010). De cette façon, nous avons mis en évidence que la PKC δ pourrait jouer un rôle dans l'activation de la voie Nrf2 et la surexpression de *hmx-1*, par les OxLDL dans les cellules endothéliales EAhy926. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait invalider ou surexprimer la PKC δ comme l'ont fait Zhang et al (2009) sur des cellules de neuroblastome. Signalons cependant que ces mêmes auteurs font remarquer dans leurs conclusions que l'effet de la PKC δ pourrait être direct (sur Nrf2) ou indirect (sur des protéines favorisant la translocation de ou des coactivateurs de Nrf2).

L'effet différentiel entre OxLDL et MoxLDL sur l'abondance des ARNm *hmx-1* pourrait également être dû à d'autres mécanismes que la phosphorylation de Nrf2 par des kinases. Ainsi, nous avons réalisé quelques expériences « coup de sonde » avec de l'actinomycine D pour voir s'il y avait des différences de stabilité de l'ARN messenger *hmx-1* dans les cellules EAhy926 stimulées avec des Ox- et MoxLDL. Les résultats obtenus ne montrent pas de variation importante du temps de demi-vie de l'ARNm entre les cellules endothéliales non stimulées ou stimulées avec les LDL natives ou oxydées. En effet, ce temps de demi-vie est de l'ordre de 2 heures pour toutes les conditions. De plus, nous avons également mis en évidence que la surexpression de *hmx-1* induite par les LDL oxydées est dépendante de la transcription étant donné que l'ajout d'actinomycine D avant stimulation empêche cette surexpression de *hmx-1* (Figure III-8).

Enfin, il existe aussi d'autres facteurs de transcription redox-sensibles que Nrf2 dont AP-1 et NF κ B, capables d'induire l'expression d'une série de gènes impliqués dans la réponse adaptative au stress oxydatif, dont *hmx-1*. Ces facteurs de transcription sont connus pour être activés suite à un stress oxydatif important, contrairement au facteur de transcription Nrf2 activé par un stress oxydatif plus modéré. Nous avons évalué l'activité transactivatrice d'AP-1 et de NF κ B par transfection des cellules EAhy926 avec un système rapporteur simple luciférase. Comme le montre la Figure III-2, aucune activation du facteur de transcription AP-1 n'est observée dans aucune des conditions stimulées par rapport à la condition contrôle.

Cependant, l'activité d'AP-1 est augmentée en présence de SIN-1, le contrôle positif, connu pour générer un stress oxydatif important. Cette expérience n'ayant été réalisée qu'une fois, nécessite d'être répétée afin d'être confirmée. Toutefois, nous pouvons suggérer, sur base de ce résultat, que le stress oxydatif généré par les MoxLDL dans les cellules endothéliales EAhy926 n'est pas suffisant pour activer le facteur de transcription AP-1. Par contre, le facteur de transcription NFκB est activé en présence de LDL oxydées au cuivre, mais pas en présence de MoxLDL (figure III-3a). Le Trolox n'a pas d'effet sur l'activité transactivatrice de NFκB induite par les OxLDL. Cette activation de NFκB par les OxLDL pourrait en partie s'expliquer par les TLR. Ceci pourrait donc fournir une piste explicative concernant l'activation indépendante des ROS de NFκB par les OxLDL. Etant donné qu'il existe des sites de liaison de NFκB dans le promoteur de *hmox-1* et que NFκB est activé par les OxLDL, ce facteur de transcription pourrait également intervenir dans la surexpression de *hmox-1* induite par les OxLDL. En effet, l'invalidation de Nrf2 par les siRNA (Figure III-7) ne permet pas de réduire totalement la surexpression de *hmox-1* induite par les OxLDL, contrairement aux MoxLDL, suggérant que d'autres facteurs de transcription que Nrf2 interviennent dans la régulation de *hmox-1* par les OxLDL, mais pas par les MoxLDL.

Le travail d'élucidation des voies de signalisation différentielles déclenchées par les Ox- et MoxLDL dans les cellules endothéliales versus les macrophages est loin d'être terminé. Il reste du travail pour approfondir le sujet et divers aspects pourraient être étudiés par la suite.

Au vu de nos résultats, un autre antioxydant pourrait être utilisé afin de s'assurer que le Trolox n'interagit pas avec les LDL ou le système expérimental. Cependant, le choix d'un autre antioxydant doit être fait avec précaution, afin notamment d'éviter toute toxicité pour les cellules endothéliales. En effet, au cours de ce mémoire, nous avons également testé la N-acétyl cystéine (NAC), qui s'est avérée toxique à la concentration nécessaire afin de diminuer totalement la production de ROS induite par les MoxLDL.

Bien que plusieurs expériences aient déjà été réalisées en triplicats, certains résultats mériteraient d'être confirmés par d'autres approches. Par exemple, l'usage de siRNA contre la PKCδ nous permettrait de confirmer l'implication de cette kinase dans l'activation de la voie de signalisation Nrf2 par les OxLDL et ainsi de voir si nous obtenons bien le même effet que lors de l'usage de l'inhibiteur de PKCδ, la Rottlérine. En effet, les inhibiteurs ne sont jamais totalement spécifiques et en outre la Rottlérine a des effets PKCδ indépendants d'autant plus ennuyeux qu'ils s'exercent sur l'expression de la *hmox-1*.

Bien que nous ayons étudié l'activation de diverses voies comme Nrf2, AP-1 et NFκB, connues pour être activées par un stress oxydatif, d'autres voies de signalisation comme les PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), les LXR (liver X receptors), FOXO3 (forkhead box O3), ou les Sirtuines, pourraient aussi être régulées par les LDL oxydées. Les PPAR et LXR sont activés par les lipides oxydés et sont notamment exprimés dans les cellules spumeuses, dans lesquelles ils contrôlent le métabolisme du cholestérol et des acides gras, mais régulent aussi l'inflammation, composantes de l'athérosclérose. Etant donné que les PPAR et les LXR sont activés par les LDL oxydées, il serait intéressant d'évaluer l'activité de ces facteurs de transcription suite à l'incubation des cellules EAhy926 en présence de OxLDL ou de MoxLDL. En effet, étant donné que la partie lipidique des OxLDL est oxydée contrairement aux MoxLDL, on peut s'attendre à une activation plus importante des PPAR et/ ou de LXR en présence des OxLDL. De plus, ces récepteurs constituent également d'intéressantes cibles pour le traitement contre l'athérosclérose (Touyz and Schiffrin 2006; Hong and Tontonoz 2008). D'autre part, la voie de signalisation FOXO est

activée suite à un stress oxydatif et contribue à la régulation de ce stress oxydatif. Il serait dès lors intéressant d'évaluer l'activité plus particulièrement de FOXO3, suite à l'incubation des cellules endothéliales avec les LDL oxydées. Enfin, le rôle des Sirtuines, des histones déacétylases, dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que le métabolisme, la croissance cellulaire ou l'apoptose, est de mieux en mieux décrit. De manière intéressante, l'activité des Sirtuines est régulée par le stress oxydatif et il a été démontré que SIRT3 en particulier, avait un effet protecteur contre le stress oxydatif. De plus, SIRT1 jouerait un rôle protecteur vis-à-vis de l'athérosclérose chez les souris ApoE^{-/-} (Yang and Ming 2010). L'activité des Sirtuines pourrait donc être évaluée dans les cellules endothéliales incubées en présence de LDL modifiées. Une différence potentielle dans l'activation de ces différentes voies ou protéines par les OxLDL ou les MoxLDL pourrait contribuer à expliquer l'effet distinct observé entre ces deux types de LDL modifiées.

De plus, on pourrait également approfondir les interactions entre divers facteurs de transcription, comme NFκB et Nrf2, récemment décrits pour avoir une influence mutuelle l'un sur l'autre (Jin, Wang et al. 2008; Jin, Zhu et al. 2008). En effet, un des gènes cibles de Nrf2, *hmox-1*, étudié lors de ce mémoire, est également régulé par d'autres facteurs de transcription comme AP-1 et NFκB, nous interrogeant sur les possibles interactions entre ces divers facteurs de transcription.

Enfin, pour expliquer pourquoi les MoxLDL déclenchent un puissant stress oxydatif, mais avec une activation modeste de la voie Nrf2 et une induction faible de *hmox-1*, on peut admettre l'hypothèse de phosphorylations inhibitrices, comme le suggèrent nos résultats de la Figure III-10.

La composante inflammatoire étant présente tout au long du processus d'athéromatose, elle mériterait également d'être étudiée au même titre que la composante oxydative. Par exemple, l'étude de cytokines pro-inflammatoires telles que l'Interleukine 8 (IL-8) et de la Pentraxine 3 (PTX3) nous permettrait de mettre en évidence l'activation du processus inflammatoire, mais également de comparer cette activation lors d'une stimulation avec des LDL oxydées au cuivre ou à la myéloperoxydase.

Comme nous l'avons déjà évoqué plus haut, les récepteurs « scavenger » pourraient aussi expliquer les réponses différentielles entre les LDL oxydées au cuivre ou à la MPO. Une étude des récepteurs « scavenger » est donc indispensable (thèse de Ludmilla Caesens-Koenig) afin de différencier les récepteurs « scavenger » spécifiques d'un modèle d'oxydation ou l'autre. Il serait notamment intéressant de voir si les MoxLDL interagissent avec le récepteur LOX-1, décrit pour capter les OxLDL.

Durant ce mémoire, nous nous n'avons cultivé les cellules endothéliales qu'en conditions statiques pour pouvoir approfondir la partie dynamique à l'avenir (thèse de Ludmilla Caesens-Koenig), en exposant les cellules à un « shear stress ». Le « shear stress » endothélial se définit comme la force tangentielle dérivée de la friction du sang sur la surface endothéliale de la paroi vasculaire. Un « shear stress » physiologique et laminaire est décrit comme athéro-protecteur. Cependant, si l'intensité ou l'orientation du flux varie, l'effet protecteur disparaît laissant place à des effets favorisant le développement de la pathologie, comme par exemple la diminution de la production de NO, l'augmentation de la perméabilité de l'endothélium, l'augmentation de la synthèse de ROS par la NAD(P)H oxydase ou la xanthine oxydase favorisant l'oxydation des LDL, ... (Chatzizisis, Coskun et al. 2007). Dans le cadre de la thèse de Damien Calay et du mémoire de Ludmilla Caesens-Koenig (2009-2010), un modèle de chambre en flux a été mis au point au laboratoire, reproduisant un flux physiologique dans un circuit fermé et stérile permettant de mieux reproduire la situation des

cellules endothéliales *in vivo*. Dans sa thèse Ludmilla Caesens-Koenig évaluera les effets différentiels des LDL natives et modifiées sur des cellules endothéliales soumises à des conditions de « shear stress » anti- ou pro-athérogènes.

En conclusion, nous avons montré que les OxLDL activaient la voie Nrf2 et une surexpression de l'expression de la *hmx-1*, mais via des mécanismes d'activation et de régulation complètement distincts par rapport à ceux mis en évidence par Calay et al (2010) sur macrophages murins et humains. Par ailleurs la réponse des cellules endothéliales aux MoxLDL diffère également de celle mise en évidence par ces mêmes auteurs sur macrophages murins et humains. La poursuite de ces travaux en intégrant les données de ce mémoire et en étudiant en particulier les kinases activées par le « shear stress » et les LDL modifiées et leur impact sur la voie Nrf2, devrait permettre de mieux comprendre l'importance patho-physiologique des MoxLDL, plus pertinentes que les OxLDL dans le contexte de l'athérosclérose.

V. Bibliographie

- Adachi, H. and M. Tsujimoto (2006). "Endothelial scavenger receptors." Prog Lipid Res **45**(5): 379-404.
- Adachi, H., M. Tsujimoto, et al. (1997). "Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells." J Biol Chem **272**(50): 31217-31220.
- Afonyushkin, T., O. V. Oskolkova, et al. (2010). "Involvement of CK2 in activation of electrophilic genes in endothelial cells by oxidized phospholipids." J Lipid Res.
- Alam, J. and J. L. Cook (2007). "How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene?" Am J Respir Cell Mol Biol **36**(2): 166-174.
- Anwar, A. A., F. Y. Li, et al. (2005). "Induction of heme oxygenase 1 by moderately oxidized low-density lipoproteins in human vascular smooth muscle cells: role of mitogen-activated protein kinases and Nrf2." Free Radic Biol Med **39**(2): 227-236.
- Badimon, L., G. Vilahur, et al. (2009). "Lipoproteins, platelets and atherothrombosis." Rev Esp Cardiol **62**(10): 1161-1178.
- Bergt, C., S. Pennathur, et al. (2004). "The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(35): 13032-13037.
- Berliner, J. A. and J. W. Heinecke (1996). "The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis." Free Radic Biol Med **20**(5): 707-727.
- Bloom, D. A. and A. K. Jaiswal (2003). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I κ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression." J Biol Chem **278**(45): 44675-44682.
- Bobryshev, Y. V. (2006). "Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis." Micron **37**(3): 208-222.
- Bonaventura, D., C. N. Lunardi, et al. (2009). "Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase." J Inorg Biochem **103**(10): 1366-1374.
- Bonetti, P. O., L. O. Lerman, et al. (2003). "Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(2): 168-175.
- Bonn, V., R. C. Cheung, et al. (2002). "Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, induces the synthesis and secretion of apolipoprotein AI in HepG2 cells and primary hamster hepatocytes." Atherosclerosis **163**(1): 59-68.
- Borchi, E., V. Bargelli, et al. (2010). "Enhanced ROS production by NADPH oxidase is correlated to changes in antioxidant enzyme activity in human heart failure." Biochim Biophys Acta **1802**(3): 331-338.
- Boudjeltia, K. Z., I. Legssyer, et al. (2006). "Triggering of inflammatory response by myeloperoxidase-oxidized LDL." Biochem Cell Biol **84**(5): 805-812.
- Burkitt, M. J. (2001). "A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin." Arch Biochem Biophys **394**(1): 117-135.
- Calay, D., A. Rousseau, et al. (2010). "Copper and myeloperoxidase-modified LDLs activate Nrf2 through different pathways of ROS production in macrophages." Antioxid Redox Signal **13**(10): 1491-1502.
- Carr, A. C., M. R. McCall, et al. (2000). "Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(7): 1716-1723.

- Chatzizisis, Y. S., A. U. Coskun, et al. (2007). "Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior." J Am Coll Cardiol **49**(25): 2379-2393.
- Chen, X. L., G. Dodd, et al. (2006). "Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(5): H1862-1870.
- Collins, A. R., C. J. Lyon, et al. (2009). "Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes." Circ Res **104**(6): e42-54.
- Cullinan, S. B. and J. A. Diehl (2004). "PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress." J Biol Chem **279**(19): 20108-20117.
- Cullinan, S. B. and J. A. Diehl (2006). "Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway." Int J Biochem Cell Biol **38**(3): 317-332.
- Cullinan, S. B., D. Zhang, et al. (2003). "Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival." Mol Cell Biol **23**(20): 7198-7209.
- Dalton, T. P., H. G. Shertzer, et al. (1999). "Regulation of gene expression by reactive oxygen." Annu Rev Pharmacol Toxicol **39**: 67-101.
- Daniels, T. F., K. M. Killinger, et al. (2009). "Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health." Int J Biol Sci **5**(5): 474-488.
- Daugherty, A., J. L. Dunn, et al. (1994). "Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions." J Clin Invest **94**(1): 437-444.
- Davignon, J. and P. Ganz (2004). "Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis." Circulation **109**(23 Suppl 1): III27-32.
- de Winther, M. P., E. Kanters, et al. (2005). "Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(5): 904-914.
- Dhakshinamoorthy, S. and A. K. Jaiswal (2000). "Small maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase1 gene." J Biol Chem **275**(51): 40134-40141.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.
- Esterbauer, H., J. Gebicki, et al. (1992). "The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL." Free Radic Biol Med **13**(4): 341-390.
- Fearon, I. M. and S. P. Faux (2009). "Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight." J Mol Cell Cardiol **47**(3): 372-381.
- Forstermann, U. and T. Munzel (2006). "Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace." Circulation **113**(13): 1708-1714.
- Foufelle, F. and P. Ferre (2007). "[Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]." Med Sci (Paris) **23**(3): 291-296.
- Gargalovic, P. S. (2009). "Atherogenesis on the chopping block." Cell Metab **9**(5): 399-401.
- Gleissner, C. A., N. Leitinger, et al. (2007). "Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis." Hypertension **50**(2): 276-283.
- Gonzalez, C., M. T. Agapito, et al. (2007). "Chemoreception in the context of the general biology of ROS." Respir Physiol Neurobiol **157**(1): 30-44.
- Gozzelino, R., V. Jeney, et al. (2010). "Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1." Annu Rev Pharmacol Toxicol **50**: 323-354.
- Guerin, M., P. Egger, et al. (2002). "Dose-dependent action of atorvastatin in type IIB hyperlipidemia: preferential and progressive reduction of atherogenic apoB-containing lipoprotein subclasses (VLDL-2, IDL, small dense LDL) and stimulation of cellular cholesterol efflux." Atherosclerosis **163**(2): 287-296.

- Hahn, C. and M. A. Schwartz (2008). "The role of cellular adaptation to mechanical forces in atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(12): 2101-2107.
- Heinecke, J. W. (2003). "Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis." *Am J Cardiol* **91**(3A): 12A-16A.
- Herbein, G., A. Varin, et al. (2006). "NF-kappaB, AP-1, Zinc-deficiency and aging." *Biogerontology* **7**(5-6): 409-419.
- Herr, I. and K. M. Debatin (2001). "Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy." *Blood* **98**(9): 2603-2614.
- Hess, J., P. Angel, et al. (2004). "AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings." *J Cell Sci* **117**(Pt 25): 5965-5973.
- Higashi, Y., K. Noma, et al. (2009). "Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases." *Circ J* **73**(3): 411-418.
- Hill, S. A. and M. J. McQueen (1997). "Reverse cholesterol transport--a review of the process and its clinical implications." *Clin Biochem* **30**(7): 517-525.
- Hong, C. and P. Tontonoz (2008). "Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors." *Curr Opin Genet Dev* **18**(5): 461-467.
- Huang, H. C., T. Nguyen, et al. (2002). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription." *J Biol Chem* **277**(45): 42769-42774.
- Itabe, H. (2003). "Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified." *Biol Pharm Bull* **26**(1): 1-9.
- Jaiswal, A. K. (2004). "Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression." *Free Radic Biol Med* **36**(10): 1199-1207.
- Jin, W., H. Wang, et al. (2008). "Disruption of Nrf2 enhances upregulation of nuclear factor-kappaB activity, proinflammatory cytokines, and intercellular adhesion molecule-1 in the brain after traumatic brain injury." *Mediators Inflamm* **2008**: 725174.
- Jin, W., L. Zhu, et al. (2008). "Influence of Nrf2 genotype on pulmonary NF-kappaB activity and inflammatory response after traumatic brain injury." *Ann Clin Lab Sci* **38**(3): 221-227.
- Kaspar, J. W., S. K. Niture, et al. (2009). "Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress." *Free Radic Biol Med* **47**(9): 1304-1309.
- Kensler, T. W. and N. Wakabayashi (2010). "Nrf2: friend or foe for chemoprevention?" *Carcinogenesis* **31**(1): 90-99.
- Kensler, T. W., N. Wakabayashi, et al. (2007). "Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 89-116.
- Khazaei, M., F. Moien-Afshari, et al. (2008). "Vascular endothelial function in health and diseases." *Pathophysiology* **15**(1): 49-67.
- Kim, C., J. Y. Kim, et al. (2008). "Cytosolic phospholipase A(2), lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species." *BMB Rep* **41**(8): 555-559.
- Léoni, J. (2001). "Physiopathologie de l'athérosclérose: Mécanismes et prévention de l'athéromatose." (Facultés de médecine et de pharmacie de Besançon).
- Li, P. L., Y. Zhang, et al. (2007). "Lipid raft redox signaling platforms in endothelial dysfunction." *Antioxid Redox Signal* **9**(9): 1457-1470.
- Libby, P. (2007). "Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease." *Nutr Rev* **65**(12 Pt 2): S140-146.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." *Nature* **407**(6801): 233-241.
- Ma, Q. (2010). "Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications." *Pharmacol Ther* **125**(3): 376-393.
- Madamanchi, N. R., A. Vendrov, et al. (2005). "Oxidative stress and vascular disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(1): 29-38.

-
- Maher, J. and M. Yamamoto (2010). "The rise of antioxidant signaling--the evolution and hormetic actions of Nrf2." Toxicol Appl Pharmacol **244**(1): 4-15.
- Majdalawieh, A. and H. S. Ro (2010). "Regulation of IkappaBalpha function and NF-kappaB signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages." Mediators Inflamm **2010**: 823821.
- Malle, E., G. Marsche, et al. (2006). "Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid." Biochim Biophys Acta **1761**(4): 392-415.
- Mann, G. E., J. Niehueser-Saran, et al. (2007). "Nrf2/ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress: implications for atherosclerosis and preeclampsia." Sheng Li Xue Bao **59**(2): 117-127.
- Mathers, C. D. and D. Loncar (2006). "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030." PLoS Med **3**(11): e442.
- Matsuura, E., K. Kobayashi, et al. (2006). "Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis." Prog Lipid Res **45**(6): 466-486.
- Mayerhofer, T. and R. Kodym (2003). "Gadd153 restores resistance to radiation-induced apoptosis after thiol depletion." Biochem Biophys Res Commun **310**(1): 115-120.
- Maziere, C. and J. C. Maziere (2009). "Activation of transcription factors and gene expression by oxidized low-density lipoprotein." Free Radic Biol Med **46**(2): 127-137.
- McNally, J. S., M. E. Davis, et al. (2003). "Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(6): H2290-2297.
- Mertani, H. C., T. Zhu, et al. (2001). "Autocrine human growth hormone (hGH) regulation of human mammary carcinoma cell gene expression. Identification of CHOP as a mediator of hGH-stimulated human mammary carcinoma cell survival." J Biol Chem **276**(24): 21464-21475.
- Mestas, J. and K. Ley (2008). "Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis." Trends Cardiovasc Med **18**(6): 228-232.
- Michiels, C. (2003). "Endothelial cell functions." J Cell Physiol **196**(3): 430-443.
- Minamino, T. and M. Kitakaze (2010). "ER stress in cardiovascular disease." J Mol Cell Cardiol **48**(6): 1105-1110.
- Monaco, C. and E. Paleolog (2004). "Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis." Cardiovasc Res **61**(4): 671-682.
- Morita, T. (2005). "Heme oxygenase and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(9): 1786-1795.
- Morse, D. and A. M. Choi (2002). "Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived." Am J Respir Cell Mol Biol **27**(1): 8-16.
- Najjar, S. S., A. Scuteri, et al. (2005). "Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor?" Hypertension **46**(3): 454-462.
- Nicholls, S. J. and S. L. Hazen (2005). "Myeloperoxidase and cardiovascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(6): 1102-1111.
- Niture, S. K., A. K. Jain, et al. (2009). "Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance." J Cell Sci **122**(Pt 24): 4452-4464.
- Niture, S. K., J. W. Kaspar, et al. (2010). "Nrf2 signaling and cell survival." Toxicol Appl Pharmacol **244**(1): 37-42.
- Ohashi, R., H. Mu, et al. (2005). "Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis." QJM **98**(12): 845-856.
- Ohtani, K., Y. Suzuki, et al. (2001). "The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells." J Biol Chem **276**(47): 44222-44228.

- Pae, H. O., E. C. Kim, et al. (2008). "Integrative survival response evoked by heme oxygenase-1 and heme metabolites." J Clin Biochem Nutr **42**(3): 197-203.
- Park, E. J., J. H. Lim, et al. (2010). "Rottlerin induces heme oxygenase-1 (HO-1) up-regulation through reactive oxygen species (ROS) dependent and PKC delta-independent pathway in human colon cancer HT29 cells." Biochimie **92**(1): 110-115.
- Patel, H. H. and P. A. Insel (2009). "Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling." Antioxid Redox Signal **11**(6): 1357-1372.
- Pepine, C. J. (2001). "Why vascular biology matters." Am J Cardiol **88**(8A): 5K-9K.
- Pluddemann, A., C. Neyen, et al. (2007). "Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands." Methods **43**(3): 207-217.
- Ryter, S. W., J. Alam, et al. (2006). "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications." Physiol Rev **86**(2): 583-650.
- Sanson, M., N. Auge, et al. (2009). "Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention by oxygen-regulated protein 150 expression." Circ Res **104**(3): 328-336.
- Sawamura, T., N. Kume, et al. (1997). "An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein." Nature **386**(6620): 73-77.
- Shah, P. K. (2003). "Mechanisms of plaque vulnerability and rupture." J Am Coll Cardiol **41**(4 Suppl S): 15S-22S.
- Shah, P. K. (2009). "Inflammation and plaque vulnerability." Cardiovasc Drugs Ther **23**(1): 31-40.
- Shao, B., M. N. Oda, et al. (2010). "Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein." Chem Res Toxicol **23**(3): 447-454.
- Singh, R. B., S. A. Mengi, et al. (2002). "Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process." Exp Clin Cardiol **7**(1): 40-53.
- Spagnoli, L. G., E. Bonanno, et al. (2007). "Role of inflammation in atherosclerosis." J Nucl Med **48**(11): 1800-1815.
- Spickett, C. M., A. Jerlich, et al. (2000). "The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids." Acta Biochim Pol **47**(4): 889-899.
- Stocker, R. and J. F. Keaney, Jr. (2004). "Role of oxidative modifications in atherosclerosis." Physiol Rev **84**(4): 1381-1478.
- Tabas, I. (2010). "The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis." Circ Res **107**(7): 839-850.
- Tak, P. P. and G. S. Firestein (2001). "NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases." J Clin Invest **107**(1): 7-11.
- Takeshita, J., J. Byun, et al. (2006). "Myeloperoxidase generates 5-chlorouracil in human atherosclerotic tissue: a potential pathway for somatic mutagenesis by macrophages." J Biol Chem **281**(6): 3096-3104.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications." Vascul Pharmacol **45**(1): 19-28.
- Townsend, D. M., K. D. Tew, et al. (2003). "The importance of glutathione in human disease." Biomed Pharmacother **57**(3-4): 145-155.
- Wang, Z. and T. Nakayama (2010). "Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease." Mediators Inflamm **2010**: 535918.
- Wei, Y., X. M. Liu, et al. (2009). "Hypochlorous acid-induced heme oxygenase-1 gene expression promotes human endothelial cell survival." Am J Physiol Cell Physiol **297**(4): C907-915.
- Wittwer, J. and M. Hersberger (2007). "The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **77**(2): 67-77.

V. Bibliographie

- Xu, C., B. Bailly-Maitre, et al. (2005). "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions." J Clin Invest **115**(10): 2656-2664.
- Yang, Z. and X. F. Ming (2010). "The vascular SIRTainty." Aging (Albany NY) **2**(6): 331-332.
- Yoshida, H. and R. Kisugi (2010). "Mechanisms of LDL oxidation." Clin Chim Acta **411**(23-24): 1875-1882.
- Zakkar, M., K. Van der Heiden, et al. (2009). "Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(11): 1851-1857.
- Zarev, S., D. Bonnefont-Rousselot, et al. (2003). "Extent of copper LDL oxidation depends on oxidation time and copper/LDL ratio: chemical characterization." Arch Biochem Biophys **420**(1): 68-78.
- Zhang, A. Y., F. Yi, et al. (2006). "Lipid raft clustering and redox signaling platform formation in coronary arterial endothelial cells." Hypertension **47**(1): 74-80.
- Zhang, R., M. L. Brennan, et al. (2001). "Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease." JAMA **286**(17): 2136-2142.
- Zhao, L. and S. L. Ackerman (2006). "Endoplasmic reticulum stress in health and disease." Curr Opin Cell Biol **18**(4): 444-452.
- Ziouzenkova, O., A. Sevanian, et al. (1998). "Copper can promote oxidation of LDL by markedly different mechanisms." Free Radic Biol Med **24**(4): 607-623.
- Zouaoui Boudjeltia, K., N. Moguilevsky, et al. (2004). "Oxidation of low density lipoproteins by myeloperoxidase at the surface of endothelial cells: an additional mechanism to subendothelium oxidation." Biochem Biophys Res Commun **325**(2): 434-438.

